

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO DE
CARNE MECANICAMENTE SEPARADA (CMS) E
CARÇAÇAS MANUALMENTE DESOSSADAS (CMD)
DE FRANGO POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**

TESE DE DOUTORADO

Mari Silvia Rodrigues de Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO DE CARNE
MECANICAMENTE SEPARADA (CMS) E CARÇAÇAS
MANUALMENTE DESOSSADAS (CMD) DE FRANGO POR
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**

Mari Silvia Rodrigues de Oliveira

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Nelcindo Nascimento Terra

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos
Alimentos**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a tese de Doutorado**

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO DE CARNE
MECANICAMENTE SEPARADA (CMS) E CARÇAÇAS
MANUALMENTE DESOSSADAS (CMD) DE FRANGO POR
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**

elaborada por
Mari Silvia Rodrigues de Oliveira

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Nelcindo Nascimento Terra, Dr.
(Presidente/Orientador)

Rogério Manoel Lemes de Campos, Dr. (UNIVASF)

Leadir Lucy Martins Fries, Dra. (UFSM)

Ernesto Hashime Kubota, Dr. (UFSM)

Lisianne Brittes Benitez, Dra. (UNISC)

Santa Maria, 12 de setembro de 2013.

*Dedico este trabalho aos meus filhos Lucas e Júlia
por serem simplesmente,
a razão da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por sempre estar presente na minha vida, agradeço todos os dias, por que sem fé eu nada seria.

Ao meu orientador Prof^o. Dr. Nelcindo Nascimento Terra que desde 1990, me ensinou que o curso de Farmácia ia além dos ensinamentos sobre os medicamentos, que despertou em mim o gosto pelo estudo, que vem me ensinando a ensinar, e me oportunizou muitas conquistas. Professor Nelcindo muito obrigado por tudo.

Aos meus pais Silvio e Rosa que sempre se dedicaram para que eu e as minhas irmãs estudássemos, sempre foram o melhor exemplo a seguir e pelo amor que sempre senti, sentimento que nos faz crescer fortes.

A meu marido Mauro, por sua dedicação, principalmente aos nossos filhos, pelo carinho e pela compreensão, pelo respeito a minha devoção profissional que sempre exigiu a minha ausência em nossa casa.

Aos meus filhos Lucas e Júlia que desde sempre aprenderam a valorizar os momentos que estamos juntos e entenderam que o amor que nos une é algo maior que a distância que nos separa, obrigada por existirem.

As minhas irmãs Sandra e Mara pela força e importância em minha vida.

Ao Prof^o Dr. Ernesto Hashime Kubota pelo auxílio nos momentos de dúvidas, que não foram poucos, pela colaboração fundamental para a execução deste trabalho.

Aos professores participantes da banca examinadora pelas sugestões e correções fundamentais para esse trabalho.

Por ordem de chegada à minha vida acadêmica gostaria de agradecer os meus amigos do laboratório de físico-química Marialene Manfio, Moisés Alves Dias e Aline Bolzan que sempre me acolheram da melhor forma possível, fazendo com que eu esquecesse o cansaço e juntos déssemos boas e revigorantes risadas.

Ao bolsista Felipe de Lima Franzen, acadêmico do Curso de Agronomia que além de um ótimo profissional é também um ótimo amigo que sempre me incentivou, me auxiliou, não tenho palavras que expressem a minha gratidão.

A nossa secretaria da pós-graduação Lia Cidade por todo auxílio prestado e por ter se mostrado sempre disposta a ajudar, lembrando as datas e compromissos importantes.

A minha amiga Liana Guidolin Milani, colega de mestrado e doutorado que sempre foi uma certeza de auxílio para as mais variadas dúvidas, obrigado amiga pela força e otimismo.

A minha querida amiga Ulda, por me escutar e pela energia maravilhosa que me transmite em todos os momentos difíceis da minha vida, obrigada por tudo.

As Prof.^a Luiza Helena Hecktheuer coordenadora do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos no início do curso, a Prof^a Neidi Garcia Penna atual coordenadora pelo apoio e incentivo durante a realização do curso.

Ao Professor Janio Santurio, do LAPEMI pela utilização do liofilizador, ao doutorando Régis Zanette e a bolsista de Iniciação Científica Maiara Ben Pilotto pelo auxílio fundamental na secagem das amostras.

A pós-doutoranda Carla Eliete Iochims dos Santos e ao Laboratório de Implantação Iônica (LII) do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela realização das análises dos minerais dos hidrolisados através da técnica de PIXE.

Aos professores do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos e do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelos conhecimentos transmitidos, colaboração e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos e aos demais colegas do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo convívio durante o período de realização do curso.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO DE CARNE MECANICAMENTE SEPARADA (CMS) E CARÇAÇAS MANUALMENTE DESOSSADAS (CMD) DE FRANGO POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

AUTORA: Mari Silvia R. de Oliveira
ORIENTADOR: Nelcindo Nascimento Terra
CO-ORIENTADOR: Alexandre Cichoski

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 12 de setembro de 2013.

A produção e a utilização de hidrolisados proteicos, oriundos de fontes animais e vegetais, em formulações específicas é uma área de crescente interesse. Os hidrolisados proteicos podem ser obtidos basicamente por três métodos, hidrólise alcalina, hidrólise enzimática e a hidrólise ácida. Porém, a hidrólise enzimática apresenta-se mais benéfica, e com este intuito várias enzimas das mais diferentes fontes são utilizadas, com a finalidade de obter hidrolisados proteicos, ricos em proteínas. Neste estudo foram utilizadas três enzimas proteolíticas denominadas de Papaína[®], Flavourzyme[®] e Protamex[®] para a hidrólise de carne mecanicamente separada (CMS) e carcaça manualmente desossada (CMD) de frango. A hidrólise ocorreu em banho termostático com temperatura, tempo e pH controlados e específicos para cada uma das três enzimas utilizadas. Foi determinada a composição proximal das matérias-primas e dos hidrolisados liofilizados obtidos, também foram realizadas análises de controle da hidrólise como grau de hidrólise, teores de proteínas, sólidos totais, cinzas e caracterização de aminoácidos dos hidrolisados. Os resultados foram avaliados por análise de variância e teste de médias de Tukey. Os hidrolisados proteicos obtidos da CMS e da CMD de frango apresentaram alto conteúdo proteico caracterizando-se como uma matéria-prima promissora na formulação de dietas especiais. O maior grau de hidrólise com a CMS foi obtido com a Papaína, e para a CMD a enzima mais eficiente na hidrólise enzimática foi a Protamex seguida da Papaína e da Flavourzyme. Os hidrolisados obtidos a partir da CMS com a Papaína obtiveram maior teor proteico, de sólidos solúveis e menor teor de cinzas quando comparados com outros hidrolisados obtidos com a Flavourzyme e a Protamex. Para a matéria prima CMD, os maiores teores de proteínas foram encontrados no hidrolisado obtido com a Papaína, os sólidos solúveis não variaram entre a Papaína e Protamex, porém a enzima Flavourzyme apresentou um percentual de sólidos solúveis menores ($p < 0,05$) que as outras duas enzimas. A maior concentração de cinzas dos hidrolisados provenientes da CMD obtidos com a Flavourzyme e com a Protamex (6,75% a 7,97%) é decorrente do ajustamento do pH durante a hidrólise. A composição de aminoácidos demonstra que os hidrolisados oriundos tanto da CMS como da CMD obtidos da Papaína possuem uma composição mais próxima da recomendada pelos órgãos de controle. As propriedades funcionais dos hidrolisados são altamente dependentes do grau de hidrólise. A solubilidade proteica aumentou com o aumento do grau de hidrólise e o hidrolisado que apresentou maior solubilidade foi com a CMS e com a papaína como enzima. A maior capacidade de retenção de água foi apresentada pelo hidrolisado obtido com a enzima Flavourzyme na CMS, e esta propriedade é inversamente proporcional ao grau de hidrólise. Da mesma forma a capacidade de retenção de óleo foi maior para a Flavourzyme, nas duas matérias-primas utilizadas. A capacidade emulsificante também foi maior para a Flavourzyme na CMS, já que esta propriedade também depende do grau de hidrólise. Assim, com base nos resultados obtidos conclui-se que a hidrólise enzimática torna-se uma ferramenta bastante útil na transformação das matérias-primas cárneas.

Palavras-chave: Hidrolisado protéico. Hidrólise enzimática. Carne mecanicamente separada. Carcaça manualmente desossada.

ABSTRACT

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

OBTAINMENT OF PROTEIC HYDROLYSATE FROM MECHANICALLY SEPARATED MEAT (MSM) AND MANUALLY DEBONED CHICKEN CARCASSES (MDC) BY ENZYMATIC HYDROLYSIS.

AUTHOR: Mari Silvia Rodrigues de Oliveira

ADVISER: Nelcindo Nascimento Terra

CO-ADVISER: Alexandre Cichoski

Place and Date of Defense: Santa Maria, September 12th, 2013.

The production and use of protein hydrolysates, derived from animal and vegetable sources in specific formulations is an area of growing interest. Protein hydrolysates can be obtained mainly by three methods: alkaline hydrolysis, enzymatic hydrolysis and acid hydrolysis. However, enzymatic hydrolysis shows to be more beneficial, and with this purpose various enzymes from different sources are used in order to obtain protein rich hydrolysates. Three proteolytic enzymes called Papaína®, Flavourzyme® and Protamex® were used for hydrolysis of mechanically separated meat MSM and manually deboned chicken carcass MDC. The hydrolysis occurred in a thermostatic bath with controlled temperature, time and pH, specific to each of the three enzymes used. Proximal composition of raw materials and lyophilized hydrolysates obtained was performed. Also were performed control analysis of hydrolysis such as degree of hydrolysis, protein, total solids, ash and characterization of amino acid hydrolysates. The results were evaluated by analysis of variance and Tukey test. Protein hydrolysates obtained from MSM and MDC had high protein content characterizing them as a promising raw material in the formulation of special diets. The highest degree of hydrolysis with MCS was obtained with Papaína, and the most efficient MDC enzyme in the enzymatic hydrolysis was Papaína, followed by Protamex and Flavourzyme. The hydrolysates obtained from the MCS with Papaína obtained higher protein and soluble solids content and lower ash content when compared to other hydrolysates with Protamex and Flavourzyme. For the raw MDC, the highest levels of proteins were found in the hydrolyzate obtained with Papaína, soluble solids did not vary between Papaína and Protamex, but the enzyme Flavourzyme presented a smaller percentage of soluble solids ($p < 0.05$) than the other two enzymes. The highest concentration of ash from the hydrolysates obtained from MDC with Protamex and Flavourzyme (6.75% to 7.97%) is the result of pH adjustment during hydrolysis. The amino acid composition of the hydrolysates demonstrates that both CMS and CMD derived from Papain obtained a composition closer to what is recommended by the control authorities. The functional properties of the hydrolysates are highly dependent on the degree of hydrolysis. The protein solubility increased with higher degree of hydrolysis and the hydrolyzate with highest solubility was MCS obtained from Papaína. The higher water retention capacity was presented by the enzyme hydrolyzate obtained with Flavourzyme on MSM and this property is inversely proportional to the degree of hydrolysis, such as the ability to retain oil which was higher with Flavourzyme on both raw materials. The emulsifying capacity was also higher with Flavourzyme on MSM, since this property also depends on the degree of hydrolysis. Therefore, based on the results, enzymatic hydrolysis becomes a useful tool for processing meat based raw materials.

Keywords: Protein hydrolyzate. Enzymatic hydrolysis. Mechanically separated meat. Manually deboned chicken carcasses.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo 4

Figura 1 - Grau de hidrólise para CMS e CMD durante os tempos de 60 e 120 minutos de hidrólise para as diferentes enzimas utilizadas em condições estabelecidas de pH e temperatura116

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 - Sistemas enzimáticos de hidrólise	51
Tabela 2 - Média da composição centesimal e valor calórico da carne mecanicamente separada (CMS) utilizadas no experimento	52
Tabela 3 - Composição centesimal dos hidrolisados proteicos de CMS liofilizados, obtidos através da hidrólise com diferentes enzimas	53
Tabela 4 - Grau de hidrólise apresentado durante as duas horas de hidrólise para as diferentes enzimas utilizadas em condições estabelecidas de pH e temperatura	54
Tabela 5 - Teor de proteínas dos hidrolisados obtidos de carne mecanicamente separada de frango durante o tempo de hidrólise de 120 minutos com diferentes enzimas	55
Tabela 6 - Percentual de sólidos solúveis dos hidrolisados obtidos de carne mecanicamente separada de frango durante o tempo de hidrólise de 120 minutos com diferentes enzimas	56
Tabela 7 - Percentual de cinzas dos hidrolisados obtidos de carne mecanicamente separada de frango durante o tempo de hidrólise de 120 minutos com diferentes enzimas	56
Tabela 8 - Composição de aminoácidos dos hidrolisados obtidos com diferentes enzimas a partir de carne mecanicamente separada de frango (CMS) em comparação as recomendações da FAO	57

Artigo 2

Tabela 1 - Sistemas enzimáticos de hidrólise	69
Tabela 2 - Média da composição centesimal e valor calórico da carcaça manualmente desossada (CMD) utilizadas no experimento	72
Tabela 3 - Composição proximal dos hidrolisados liofilizados de carcaça manualmente desossada (CMD) obtidos através da hidrólise com diferentes enzimas	73
Tabela 4 - Grau de hidrólise apresentado durante as duas horas de hidrólise para as diferentes enzimas utilizadas em condições estabelecidas de pH e temperatura	75
Tabela 5 - Teor de proteínas dos hidrolisados obtidos de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango durante o tempo de hidrólise de 120 minutos com diferentes enzimas	76
Tabela 6 - Percentual de sólidos solúveis dos hidrolisados obtidos de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango durante o tempo de hidrólise de 120 minutos com diferentes enzimas e a atividade de água dos hidrolisados liofilizados	77
Tabela 7 - Percentual de cinzas dos hidrolisados obtidos de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango durante o tempo de hidrólise de 120 minutos com diferentes enzimas	78

Tabela 8 - Percentual de hidrólise e rendimento total (liofilizados) dos hidrolisados obtidos de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango durante o tempo de hidrólise de 60 e 120 minutos com diferentes enzimas	79
Tabela 9 - Composição de aminoácidos dos hidrolisados obtidos com diferentes enzimas a partir de carcaça manualmente desossada de frango (CMD) em comparação as recomendações da FAO	80
Tabela 10- Valores médios da determinação de cor dos hidrolisados proteicos de carcaça manualmente desossada (CMD) obtidos através da hidrólise com diferentes enzimas, expressos como L* (luminosidade), a* (índice vermelho) e b* (índice amarelo)	82

Artigo 3

Tabela 1 - Sistemas enzimáticos de hidrólise	91
Tabela 2 - Composição proximal dos hidrolisados proteicos de CMS e CMD liofilizados, obtidos através da hidrólise com diferentes enzimas proteolíticas.	95
Tabela 3- Grau de hidrólise para CMS e CMD durante os tempos de 60 e 120 minutos de hidrólise para as diferentes enzimas utilizadas em condições estabelecidas de pH e temperatura	96
Tabela 4- Solubilidade proteica dos hidrolisados liofilizados em diferentes pHs, obtidos de CMS e de CMD através da utilização de enzimas proteolíticas	99
Tabela 5- Capacidade de retenção de óleo (mL de óleo/g de hidrolisado) dos hidrolisados proteicos obtidos de CMS e de CMD liofilizados	100
Tabela 6- Capacidade de retenção de água dos hidrolisados proteicos liofilizados obtidos de CMS e de CMD, através da utilização de enzimas proteolíticas, Papaína®, Flavourzyme® e Protamex®	101
Tabela 7- Resultados da capacidade emulsificante (mL óleo/g de amostra) e estabilidade da emulsão (%) dos hidrolisados liofilizados proteicos obtidos de CMS e de CMD de frango	103

Artigo 4

Tabela 1 - Sistemas enzimáticos de hidrólise	112
Tabela 2- Composição proximal dos hidrolisados proteicos de CMS e CMD liofilizados, obtidos através da hidrólise com as enzimas Papaína, Flavourzyme e Protamex	115
Tabela 3- Resultados dos minerais presentes nos hidrolisados proteicos liofilizados de carne mecanicamente separada (CMS) de frango obtido por hidrólise enzimática com Papaína, Flavourzyme e Protamex	118
Tabela 4- Resultados dos minerais presentes nos hidrolisados proteicos liofilizados de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango, obtidos por hidrólise enzimática com Papaína, Flavourzyme e Protamex	121

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
3.1 Avicultura nacional e mundial	33
3.2 Carne mecanicamente separada (CMS)	35
3.3 Hidrolisado proteico	37
3.4 Hidrólise enzimática.....	39
3.5 Características das Enzimas.....	39
3.6 Propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos	41
3.7 Propriedades bioativas dos hidrolisados proteicos	42
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS	45
4.1 Artigo 1 - Utilização da carne mecanicamente separada de frango para a produção de hidrolisados proteicos a partir de diferentes enzimas proteolíticas	47
Resumo	47
Abstract	47
Introdução	48
Material e Métodos	49
Resultados e Discussão	51
Conclusões	58
Referências	58
4.2 Artigo 2 - Utilização de enzimas proteolíticas para produção de hidrolisados protéicos a partir de carcaças de frango manualmente desossadas	63
Resumo	63
Summary	64
1 Introdução	65
2 Material e Métodos	67
3 Resultados e Discussão	71
4 Conclusão	82
Referências	82
4.3 Artigo 3 - Propriedades funcionais dos hidrolisados obtidos a partir de carne mecanicamente separada (CMS) e de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango através da utilização de diferentes enzimas proteolíticas	87
Resumo	87
Abstract	88
Introdução	88
Material e Métodos	89
Resultados e Discussão	93
Conclusão	103
Referências Bibliográficas	103

4.4 Artigo 4 - Conteúdo mineral de hidrolisados proteicos oriundos de carne mecanicamente separada (CMS) e de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango obtidos a partir de hidrólise enzimática	109
Resumo	109
Abstract	109
Introdução	110
Material e Métodos	111
Resultados e Discussão	114
Conclusão	122
Referências Bibliográficas	122
5 DISCUSSÃO	129
6 CONCLUSÕES	141
REFERÊNCIAS	143

1 INTRODUÇÃO

A avicultura é uma das atividades econômicas que mais tem se destacado nas últimas décadas. O seu crescimento é decorrente, sobretudo, dos avanços tecnológicos nas áreas de genética, nutrição, sanidade e manejo, os quais possibilitaram a instalação de uma indústria altamente eficiente e competitiva em todo o mundo, particularmente no Brasil. O continente americano, incluindo a América do Norte, América Central e América do Sul, é apontado como líder mundial na produção de carne de frango.

Apesar da produção de carne de frango apresentar uma queda de 3,17% em relação a 2011, o Brasil manteve a posição de maior exportador mundial e de terceiro maior produtor de carne de frango, atrás dos Estados Unidos e da China (UBABEF, 2013).

Projeções realizadas pelo Departamento de Agricultura, dos Estados Unidos (USDA), para o ano de 2014, preveem um aumento de aproximadamente 3% a mais que o projetado para o ano de 2013. No entanto, a previsão de aumento para o consumo *per capita* é bem menor, e se o consumo se expande a um ritmo mais lento que a produção, é natural que sobre mais produto para exportação, o que ocasionará um aumento de 100 mil toneladas a mais que o volume previsto para 2013 (AVISITE, 2013).

As estimativas realizadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento para o mercado de carnes no Brasil mostram que este setor deve apresentar um intenso crescimento nos próximos anos. As projeções foram realizadas para um período bastante extenso de 2010/2011 a 2020/2021, e a maior projeção de taxa de crescimento de produção foi apresentada pela carne de frango que deve crescer anualmente 2,6%, e a bovina, cujo crescimento projetado para esse período é de 2,2% ao ano. A produção de carne suína tem um crescimento projetado de 1,9% ao ano, o que também representa um valor relativamente elevado, pois consegue atender ao consumo doméstico e às exportações (BRASIL, 2011).

O consumo mundial de carnes aumentou principalmente nas duas últimas décadas, sendo este muito mais significativo em relação à carne de frango. Este aumento mundial de consumo foi mais evidente a partir dos anos 90 e várias razões

podem ser citadas como explicação para este fenômeno, como por exemplo, a não existência de restrições religiosas ao seu consumo, preços mais baixos quando comparados as demais carnes, grande diversidade de produtos da cadeia produtiva e as características nutricionais desta carne que a tornam um produto essencial a saúde humana (MACHADO, 2007).

Neste contexto, a preferência por cortes de frangos despertou a necessidade de encontrar meios para o aproveitamento de dorsos, pescoços e ossos resultantes da desossa. Dessa forma, a carne mecanicamente separada de aves (CMS) começou a ser utilizada na fabricação de inúmeros produtos como mortadelas, salsichas, salames cozidos e sopas em pó (TRINDADE; FELÍCIO; CONTRERAS-CASTILLO, 2004).

A CMS segue os parâmetros do Regulamento Técnico que estabelece a Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Aves, Bovinos e Suínos, regulamento este aprovado pela Instrução Normativa nº 4 de 31 de março de 2000 (BRASIL, 2000). Dentre estes, a composição, as características físico-químicas e microbiológicas são as variáveis mais importantes e que contribuem para determinar as características e a qualidade da carne mecanicamente separada. Neste sentido, inúmeros questionamentos surgiram quanto ao seu valor nutritivo, principalmente quanto aos níveis proteicos, de gordura e cálcio, além da estabilidade oxidativa e qualidade microbiológica desta matéria-prima (TRINDADE; FELÍCIO; CONTRERAS-CASTILLO, 2004; TRINDADE; CONTRERAS-CASTILLO; FELÍCIO, 2006).

A estrutura óssea final da desossa manual, além da própria carne mecanicamente separada podem servir de fonte proteica para a obtenção de hidrolisados proteicos, utilizados em formulações específicas. A grande maioria dos hidrolisados utilizados, presentemente, são obtidos da caseína, da proteína de soja e de peixes (ROSSI, 2007).

Os hidrolisados proteicos podem ser obtidos basicamente por três métodos: a hidrólise alcalina, a hidrólise enzimática e a hidrólise ácida ou a combinação de dois ou mais destes métodos (ADLER-NISSEN 1986; LAHL; BRAUN, 1994).

Segundo Spellman e colaboradores (2003) a hidrólise enzimática possui algumas vantagens sob os outros métodos de hidrólise como o aumento da solubilidade, o aumento das propriedades emulsificantes dos hidrolisados e também o aumento da liberação de peptídeos biologicamente ativos de certas proteínas.

Os hidrolisados proteicos podem ser utilizados em formulações específicas tais como produtos geriátricos, suplementos energéticos, dietas para controle de peso ou terapêuticas (recém-nascidos prematuros, crianças com diarreia, gastroenterite, má-absorção, fenilcetonúria e pessoas com alergia a proteínas) ou ainda dietas entéricas (AKYIAMA et al., 2006; BENITEZ; IBARZ; PAGAN, 2008).

O uso de enzimas em processos industriais é de grande interesse, em especial devido à facilidade de obtenção (por biotecnologia) e as vantagens em relação aos catalisadores químicos, como maior especificidade, menor consumo energético e maior velocidade de reação. Igualmente, a catálise enzimática tem outros benefícios, como o aumento da qualidade dos produtos, a redução dos custos de laboratório e de maquinário, visando com isto à melhoria ou a obtenção de produtos diferenciados na indústria alimentícia (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

A hidrólise produzida pelas proteases de origem animal, vegetal e microbiana tem a capacidade de modificar e melhorar as propriedades funcionais dos hidrolisados, devido a sua especificidade e aptidão de transformar uma grande variedade de grupos funcionais, que definem desta forma as possíveis utilizações para o hidrolisado obtido (SILVA; SILVESTRE, 2003; BHASKAR et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver diferentes hidrolisados em pó com alto valor proteico, a partir da hidrólise enzimática de carne mecanicamente separada (CMS) e de carcaças manualmente desossadas (CMD) de frango através da hidrólise com as enzimas proteolíticas Papaína[®], Flavourzyme[®] e Protamex[®].

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Desenvolver diferentes hidrolisados em pó com alto valor proteico, a partir da hidrólise enzimática de carne mecanicamente separada (CMS) e de carcaças manualmente desossadas (CMD) de frango com as enzimas proteolíticas Papaína[®], Flavourzyme[®] e Protamex[®].

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o rendimento dos diferentes hidrolisados proteicos obtidos através da carcaça manualmente desossada (CMD) e da carne mecanicamente separada (CMS) de frango através da hidrólise enzimática com Papaína[®], Flavourzyme[®] e Protamex[®].

- Analisar a composição proximal das matérias-primas utilizadas para a hidrólise (CMD e CMS) e dos hidrolisados proteicos liofilizados obtidos das diferentes enzimas proteolíticas.

- Determinar o grau de hidrólise durante o processo de hidrólise realizado para as duas matérias primas e com as diferentes enzimas proteolíticas.

- Caracterizar o perfil de aminoácidos presentes nos diferentes hidrolisados obtidos.

- Analisar o conteúdo mineral dos hidrolisados obtidos com as duas matérias-primas e com as diferentes enzimas proteolíticas.

- Avaliar as propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos obtidos (solubilidade proteica, capacidade de retenção de óleo, capacidade de retenção de água, capacidade de emulsificação e estabilidade de emulsão).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Avicultura brasileira e mundial

O setor avícola foi o mais eficiente no mercado de carnes mundial na última década, apresentando o maior crescimento do volume da produção entre todos os setores de carne, o que influencia positivamente o consumo mundial (FAO, 2010).

A avicultura industrial mundial teve seu maior impulso a partir da segunda grande guerra, pois diante da necessidade de destinar uma maior oferta de carne vermelha para os soldados em combate, surgiu a busca por carnes alternativas e de pequenos animais, que estivessem em peso de abate, em curto espaço de tempo (UBABEF, 2012). No Brasil, o principal fator que motivou o desenvolvimento da avicultura nacional foi a integração dos diversos segmentos da cadeia produtiva, formando um complexo agroindustrial altamente interligado, que proporciona o planejamento da atividade e a diminuição dos custos de produção (TAVARES; RIBEIRO, 2007).

As mudanças no cenário econômico nacional, ocorridas desde 1990, também contribuíram para o aumento do consumo da carne de frango no país, pois com a implantação do Plano Real, que incorporou o preço dos alimentos como controle dos índices inflacionários, a carne de frango foi citada como âncora, ou seja, como um dos produtos alimentícios que contribuíram com o objetivo da política econômica da estabilidade de preços (FARINA; NUNES, 2002; CONSIDERA; SOUSA; BRAÇAL, 2002).

O mercado mundial varia grandemente em função da estabilidade econômica dos países, e o Oriente Médio apesar de se manter como principal destino da carne de frango brasileira apresentou uma queda de 1,2% nas importações. Para a Ásia, as exportações diminuíram 0,5%, para a União Europeia este índice foi maior, 8,2% a menos, assim como para as Américas e a Oceania que também tiveram queda nas exportações de 25,2% e 22,0%, respectivamente. No entanto, os países europeus fora da União Europeia e a África, terceiro maior mercado de destino em volumes, apresentaram um aumento nas exportações de 10% e 20%, respectivamente, em relação ao ano de 2011 (UBABEF, 2013).

As exportações de carne de frango oscilaram em 2012, os cortes tiveram um aumento de 3,7%, mas com queda de 4,1% na receita cambial, já os frangos inteiros

tiveram uma diminuição de venda e de receita de 5,7%. As exportações de frangos industrializados se mantiveram estáveis (+0,3%), mas a receita foi 14,2% menor (UBABEF, 2013).

Segundo a UBABEF (2013), a receita cambial de 2012 apresentou uma queda de 6,1% quando comparada ao ano anterior. O preço médio das vendas brasileiras para o mercado externo foi de US\$1, 966 por tonelada, com uma redução de 6,1%.

Provavelmente, estas oscilações ainda sejam resultados da retração da economia mundial, devido à crise financeira internacional, com a redução de preços e de encomendas de clientes importantes como Rússia, Japão e Venezuela, e pela valorização do real frente ao dólar americano (ABEF, 2009).

Porém, este cenário vem mudando no decorrer deste ano, o governo federal está traçando estratégias para a abertura de novos mercados na América Latina para produtos do agronegócio brasileiro, entre eles o México. No primeiro semestre deste ano, o país comercializou para o mercado internacional 1,8 milhões de toneladas de carne de frango, totalizando US\$ 3,8 bilhões, o que representa uma alta de 7,9% em relação ao mesmo período do ano anterior (MOTTA, 2013).

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário da avicultura mundial e isto se deve as profundas mudanças ocorridas na avicultura industrial brasileira. O excelente desempenho no mercado interno e externo pode ser alcançado através de duas estratégias, a redução do custo das matérias-primas e a observação das necessidades específicas dos consumidores (MARTINELLI; SOUZA, 2005).

O sistema de integração promovido pela agroindústria pode ser considerado um dos grandes fatores de sucesso da avicultura nacional. O país procurou modernização e utilizou instrumentos como o manejo adequado do aviário, sanidade, alimentação balanceada, melhoramento genético e produção integrada. A parceria entre indústria e avicultores também contribuiu para a excelência técnica em todas as etapas da cadeia produtiva, resultando em reduzidos custos de transação e na qualidade, que atende às demandas de todo o mundo (JUNIOR et al.,2007).

A cadeia produtiva de carne de aves é um exemplo de como a interação entre os setores de pesquisa, insumos, produção, transformação e distribuição podem contribuir para o sucesso de uma atividade e seu contínuo desenvolvimento.

3.2 Carne mecanicamente separada (CMS)

O tema das tendências mundiais da oferta de novos alimentos pontua quatro características relacionadas às inovações de alimentos no mundo, que são primeiramente o prazer pelo alimento, em segundo a praticidade, em terceiro a questão da saúde e por último a questão da forma física. Estes fatores são imprescindíveis para se avaliar o padrão de consumo atual e sua configuração para o futuro (MACHADO, 2007).

A carne de frango tem potencial para se encaixar nestes quatro fatores, e a busca pela praticidade alavanca a pesquisa por novos produtos industrializados, assim como por diferentes tipos de cortes. No final da década de 50 surgia nos Estados Unidos, a carne mecanicamente separada (CMS), como uma forma de aproveitamento de dorsos, pescoços e demais ossos resultantes da desossa manual, que possuem em média 24 % da parte comestível da carcaça (FIELD, 1988 ; TRINDADE;FELÍCIO;CONTRERAS-CASTILLO, 2004). Esta tecnologia mecânica visa à retirada de carne de matérias primas de valor comercial inferior, como por exemplo, pescoço e dorso, e que contem aproximadamente 70% de carne mecanicamente recuperável (BERAQUET, 1989).

A adequação do maquinário utilizado na obtenção da CMS é um fator de extrema importância, pois dele depende o rendimento do processo, assim como também a influencia na textura e consistência do produto final. Dentro deste contexto, a qualidade da CMS pode ser comprometida por vários fatores, como a pressão aplicada sobre a matéria-prima que é proporcional a quantidade de ossos, tendões e outros resíduos não cárneos no produto final. Além do processo, outros fatores podem influenciar a composição da CMS como a relação músculo/osso, idade da ave, quantidade de pele, corte e tipo de desossa e quantidade de pigmentos heme (FRONING, 1981; NUNES, 2003).

Segundo McMindes e Siedler (1988), o processo de separação mecânica libera grandes quantidades de lipídeos e hemoglobina da medula óssea, a estrutura fibrosa da carne também é quebrada em pequenas partículas estes e outros fatores inerentes ao processo como a incorporação de ar, contato com os metais e a elevação da temperatura durante a desossa contribuem para a oxidação lipídica e dos pigmentos (FIELD, 1988). Esta é considerada uma das principais perdas de

qualidade de carne mecanicamente separada e dos produtos cárneos em geral (MORRISEY et al., 1998).

A contaminação microbiana também preocupa quem utiliza a CMS como matéria-prima, já que o aumento de área de superfície e o pequeno tamanho das partículas, juntamente com o pH e atividade de água elevados, além da liberação de fluídos celulares ricos em nutrientes, devido à maceração do tecido e ao calor gerado durante o processo de desossa mecânica, tendem a propiciar um desenvolvimento bacteriano elevado (KUMAR; PEDERSEN-WISMER; CASPERSEN, 1986).

Trindade et al. (2008), avaliaram a qualidade de carnes mecanicamente separadas (CMS) obtidas de duas diferentes linhagens de aves (galinhas matrizes de corte e galinhas poedeiras comerciais brancas) através da contagem de microrganismos psicotróficos e mesófilos aeróbios, estafilococos coagulase positiva, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp. e *E. coli*. Os resultados médios de coliformes fecais obtidos por estes autores foram de 10^2 NMP.g⁻¹, tanto para a CMS de galinha matriz quanto de galinha poedeira, e as CMS obtidas atenderam perfeitamente aos padrões microbiológicos da Legislação Brasileira e não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. e Estafilococos coagulase positiva em nenhuma das amostras analisadas durante todo o período de estocagem.

A CMS tem suas características e definições de qualidade apresentadas no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Aves, Bovinos e Suínos aprovado pela Instrução Normativa nº 4 de 31 de março de 2000 (BRASIL, 2000). Segundo este regulamento várias recomendações devem ser seguidas como, a utilização unicamente de ossos, carcaças ou partes de carcaças de animais de açougue, que tenham sido aprovadas para consumo humano pelo SIF (Serviço de Inspeção Federal), vetando-se a utilização de cabeças, pés e patas. Outros requisitos também devem ser cumpridos como tratamento dos ossos antes da separação mecânica, observando-se relações de tempo e temperatura que assegurem as características de qualidade para posterior utilização na separação mecânica (BRASIL, 2000).

3.3 Hidrolisado protéico

Os hidrolisados proteicos tem despertado grande interesse da indústria de alimentos, e são produzidos com várias finalidades. A produção de hidrolisados proteicos iniciou na década de 40, com a produção dos hidrolisados de peixes, denominados pela sigla FPH (*Fish Protein Hydrolysed*), conforme designado pela *Food and Agriculture Organization* (FAO), produto que pode possuir uma concentração de proteína de 90%, além de apresentar propriedades funcionais úteis para a indústria alimentícia (OETTERER, 2001).

Segundo Mira e Marquez (2000), na década de 70, no Japão iniciaram-se as pesquisas sobre a possibilidade de produção de hidrolisados proteicos com baixo teor de fenilalanina.

A grande concentração de proteínas apresentada pelos hidrolisados torna-o um produto diferenciado, pois proteínas são componentes alimentares fundamentais para os seres vivos (GIESE, 1994). As proteínas estão amplamente difundidas na natureza, porém poucos alimentos possuem todos os aminoácidos essenciais, como os de origem animal. As carnes, peixes, aves, ovos, leite e queijos possuem proteínas de boa qualidade, suficientes para torná-los as melhores fontes de aminoácidos essenciais (OLIVEIRA; MARCHINI, 1998).

As proteínas mais usualmente utilizadas para a produção de hidrolisados proteicos são as derivadas do leite (caseína, lactoalbumina e as proteínas do soro), soja, carne e pescado (FREITAS et al., 1993; LAHL; BRAUN, 1994).

A partir da matéria-prima que origina a CMS ou então através da utilização da própria CMS de frango pode-se produzir hidrolisados proteicos, que são produtos destinados ao uso nutricional de indivíduos que apresentam necessidades nutricionais e/ou fisiológicas que não são sanadas pela alimentação usual. A hidrólise de proteínas é basicamente o resultado da clivagem de suas ligações peptídicas, liberando peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres (ABERT; KNEIFEL, 1993; FROKJAER, 1994).

Os hidrolisados proteicos podem ser obtidos basicamente por três métodos: a hidrólise alcalina, a hidrólise enzimática e a hidrólise ácida ou a combinação de dois ou mais destes métodos (ADLER-NISSEN, 1986; LAHL; BRAUN, 1994). A hidrólise enzimática apresenta algumas vantagens em relação à hidrólise química (ácida ou alcalina), como por exemplo, a maior especificidade de ação, o maior controle da

hidrólise, as condições moderadas de ação, o menor conteúdo de sal no hidrolisado obtido, além da menor quantidade de enzimas e da facilidade para inativá-las (ZAVAREZE et al., 2009).

Estudos demonstram que indivíduos com síndrome de má absorção ou problemas de digestão tem uma maior eficiência metabólica quando utilizam os hidrolisados proteicos (SGARBIERI, 1996). Segundo Clemente (2000), os principais usos dos hidrolisados na alimentação humana podem ser sob a forma de suplementação proteica em bebidas energéticas, produtos geriátricos, nutrição esportiva e dietas para controle de peso, quando utilizados para uso clínico, estes podem ser utilizados para tratar fenilcetonúria, doenças crônicas e agudas, síndrome do intestino curto, doença de Crohn, pancreatites, colites ulcerativas, além de compor fórmulas infantis hipoalergênicas.

Hidrolisados proteicos também podem ser utilizados como realçadores de sabor, em sopas, molhos, *snacks*, produtos de carne e outros salgados (WEIR, 1986).

Segundo Frokjaer (1994), as proteínas hidrolisadas apresentam um grande número de propriedades funcionais, que as tornam promissoras para a utilização em nutrição humana, tanto para fins médicos quanto para produtos em geral. Quando desidratados estes hidrolisados apresentam como maior diferencial a vida de prateleira maior, além do alto conteúdo proteico e da maior solubilidade e digestibilidade (STANLEY, 1981; PEDERSEN, 1994).

Atualmente, a indústria pesqueira tem uma importância econômica bastante significativa para um grande número de países, vários estudos tem se dedicado a produção de hidrolisados de peixes. Outro fator de impacto é que a indústria de processamento de peixes produz mais de 60% de subprodutos como resíduos, que incluem a cabeça, pele, nadadeiras, vísceras e ovas, e apenas 40% de produtos da pesca são realmente utilizados, surgindo assim o interesse em agregar valor recuperando os nutrientes essenciais e os compostos bioativos que ajudam a melhoria da saúde humana e resolvem os problemas de poluição (DEKKERS et al., 2011; HERPANDI et al., 2012).

Dentre as várias propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos as principais são a fácil digestibilidade, alta solubilidade em água, alto conteúdo proteico e maior *shelf-life* no caso dos desidratados (STANLEY, 1981; PEDERSEN, 1994).

3.4 Hidrólise enzimática

O processo enzimático é o mais indicado para a produção de hidrolisados, pois preserva as propriedades sensoriais e não promove o aumento da osmolaridade do meio, o que acabaria por dificultar a absorção dos aminoácidos presentes no hidrolisado (SGARBIERI, 1996; SANTOS; SANTOS NETO; VASCONCELLOS, 2003).

As enzimas proteolíticas possuem um papel biotecnológico de destaque nas diversas áreas de utilização como, por exemplo, a indústria farmacêutica, alimentícia, de couro, de detergentes e de hidrolisados proteicos (AL-SHEHRI et al., 2004).

O processo de hidrólise enzimática contribui na melhoria das propriedades funcionais das proteínas, muitos alimentos têm sido modificados por proteases, como a soja, concentrados proteicos de peixe, carnes e queijos, no intuito de se obter produtos de melhor qualidade sensorial (CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1989).

Com o advento destas técnicas enzimáticas, diferentes hidrolisados de proteínas de peixes são produzidos a partir de vários resíduos da industrialização de peixes (BEAULIEU et al., 2009; AHN; LEE; JE, 2010; DUAN et al., 2010) e possuem uma variedade de aplicações incluindo produtos farmacêuticos, cosméticos e nutrição animal (OLIVA-TELES; CERQUEIRA; GONÇALVES, 1999; WERGEDAHL et al., 2004).

Os microrganismos representam uma excelente fonte de proteases de aplicações industriais devido a sua grande diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética, mas várias enzimas podem ser obtidas de animais (pancreatina, tripsina, quimotripsina, pepsina, renina e outras) ou vegetais (papaína, bromelina, ficina e outras) (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

3.4.1 Características das enzimas

O mamoeiro (*Carica papaya L.*) é uma planta herbácea tipicamente tropical que tem a característica de produção rápida e frequente o ano inteiro (ARAUJO FILHO, 2002). Segundo a *Food and Agriculture Organization* – FAO (2009), o Brasil é o maior produtor mundial desta fruta considerada como uma das mais cultivadas

no mundo, pois mais de cinquenta países a cultivam, destacando-se no cenário internacional a produção nos seguintes países: Brasil, México, Nigéria, Índia, Indonésia, Etiópia, Congo, Peru, China e Venezuela.

O mamão é uma fruta de grande aceitação no mercado internacional e nacional, tanto pelo seu valor nutritivo, como pelo poder medicinal. Os frutos do mamoeiro são consumidos basicamente na forma *in natura* e contêm vitamina A e C, cálcio, fósforo, ferro e papaína. A papaína é uma enzima empregada para os mais variados usos nas indústrias têxteis, farmacêuticas, alimentícias, cosméticas (CENTEC, 2004; PAQUES; MACEDO, 2006), na medicina e em pesquisas (SANGEETHA; ABRAHAM, 2006; LI; XING; DING, 2007).

As enzimas proteolíticas de origem vegetal, mais amplamente conhecida são a papaína, bromelina e actinidina e suas fontes são mamão, abacaxi e kiwi respectivamente, todas classificadas como cisteína proteases, pois possuem um resíduo de cisteína no sítio ativo, e são representadas por proteínas com massas moleculares em torno de 21-30 kDa (BARRET; RAWLINGS, 2001), cuja maior atividade hidrolítica ocorre em pH 4,0-6,5.

Dentre estas proteases destaca-se a família da papaína (E.C. 3.4.22.2), que é obtida a partir do látex que flui por incisão no fruto ainda não maduro do *Carica papaya* e possui em sua cadeia 212 resíduos de aminoácidos (BJORK ; YLINENJARVI, 1990; EVANGELISTA, 2000; GRZONKA, 2001).

Vários estudos citam a papaína como uma eficiente enzima proteolítica, como o realizado por Webster; Ledward e Lawrie (1982), no qual os pesquisadores avaliaram diferentes enzimas proteolíticas na hidrólise de fígado e rumem bovino e a papaína mostrou-se mais efetiva. Também Fonkwe e Singh (1996), utilizaram a papaína para recuperar proteínas do resíduo de carne mecanicamente separada de peru e obtiveram um rendimento de 113 g de hidrolisado liofilizado para 1 kilo de CMS de peru. Os autores utilizaram 1g de papaína para cada 250 g de CMS de peru e obtiveram uma recuperação proteica total de 46%, o hidrolisado apresentou 78% de proteína e 5,7% de lipídeos.

Proteases de origem microbiana são preferidas às enzimas de plantas e animais, uma vez que elas possuem a maioria das características desejadas para aplicação em biotecnologia e são responsáveis por 60% da venda total mundial de enzimas (SINGH et al., 2001).

A Flavourzyme é uma aminopeptidase produzida por fermentação submersa de uma linhagem selecionada do fungo *Aspergillus oryzae*, a proteína enzimática é separada e purificada do organismo produtor e utilizada para hidrólise de proteínas sob condições neutras ou levemente ácidas (SLIZYTE et al, 2005). As condições ótimas relatadas para Flavourzyme1000L® são pH 7,0, com temperatura ótima em torno de 50 °C. A Flavourzyme1000 L® é uma exopeptidase com uma atividade de 1000 LAPU/g (E.C. 3.4.11.11). Uma LAPU (Unidade Leucina Aminopeptidase) é a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de leucina-p-nitroanilida por minuto. Flavourzyme é uma protease que produz hidrolisado com propriedades funcionais e sensoriais aceitáveis, como por exemplo, menor sabor amargo que poderia limitar a sua utilização (KRISTINSSON ; RASCO, 2000b).

A Protamex® é uma enzima proteolítica (E.C.3.4.21.14) produzida por fermentação submersa de *Bacillus licheniformes* e *Bacillus amyloliquefaciens* com atividade declarada de 1,5 AU-NH/g. A Protamex é um produto em conformidade com as especificações de pureza recomendadas para as enzimas de grau alimentício definidas pelo Joint FAO/WHO *Expert Committee on Food Additives* (JECFA) e o *Food Chemical Codex* (FCC) (LIASET et al., 2002). As condições de trabalho ideais para Protamex® são registradas como sendo pH 5,5-7,5 a uma temperatura de 35-60 ° C.

3.4.2 Propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos

A hidrólise enzimática de polímeros em alimentos, como por exemplo, de proteínas, é um processo importante que tem sido utilizado para melhorar propriedades físicas, químicas e funcionais dos alimentos, sem depreciar seu valor nutritivo, melhorando, principalmente, as características de absorção das proteínas.

As transformações estruturais proporcionadas pelo processo de hidrólise enzimática são capazes de alterar e aprimorar as propriedades funcionais, como por exemplo, solubilidade proteica, capacidade de retenção de água, capacidade de retenção de óleo, capacidade de emulsificação, entre outras (BHASKAR et al., 2007). Neste sentido, a hidrólise enzimática torna-se mais eficiente devido à sua especificidade, segurança e capacidade de modificar uma grande variedade de grupos funcionais (PEARCE, 1995).

Contudo, o controle do processo hidrolítico é fundamental, já que o grau de hidrólise influencia diretamente nas propriedades funcionais, ou seja, a melhoria dessas propriedades está diretamente relacionada ao tamanho da cadeia peptídica e segundo alguns autores, esse efeito benéfico da ação enzimática é observado para peptídeos contendo mais de 20 resíduos de aminoácidos (CREAMER; OLSON, 1982; MAHMOUD et al., 1992; KRISTINSSON ; RASCO, 2000c).

A solubilidade é uma propriedade funcional importante pois varia de acordo com determinados valores de pH, temperatura, concentração e conteúdo de sal em solução. Mesmo hidrolisados com baixos graus de hidrólise exibem uma maior solubilidade, quando comparados com as proteínas intactas (CHOBERT et al., 1989; NIELSEN, 1997). No entanto, uma hidrólise mais profunda, o que é amplamente utilizada para a produção de hidrolisados hipoalergênicos, praticamente os priva da sua capacidade de emulsificação (AGBOOLA et al., 1998).

Vários estudos relatam as propriedades funcionais das proteínas hidrolisadas da caseína e do soro do leite (FURTADO et al., 2001; PACHECO et al., 2005; ROMAN; SGARBIERI, 2005) e de muitas espécies de peixes (THIANSILAKUL; BENJAKUL; SHAHIDI., 2007; ZARAVESE et al., 2009; KTARI et al., 2012), mas são raros os que avaliam as propriedades funcionais dos hidrolisados obtidos de carne de frango (SCHMIDT; SALAS-MELLADO, 2009).

A análise das propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos independente da matéria-prima da qual eles são obtidos trazem informações que predizem a sua utilização dentro da indústria alimentícia ou farmacêutica.

3.4.3 Propriedades bioativas dos hidrolisados proteicos

Enzimas proteolíticas de inúmeras fontes (animal, vegetal e microbiana) são potentes biocatalisadores para a obtenção de hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos em escala industrial.

Os peptídeos bioativos tem sido alvo de muitas pesquisas relacionadas às atividades antioxidantes, antimicrobiana e anti-hipertensiva. Os peptídeos bioativos são pequenos fragmentos de proteína com atividades biológicas benéficas que podem ser produzidos durante o processo de transito gastrointestinal *in vivo* ou então, por digestão anterior pelos processos de hidrólise de proteínas *in vitro* (VIOQUE et al., 2000; GOBBETTI et al., 2002; PIHLANTO; KORHONEN, 2003).

De acordo com Möller et al., (2008), para um composto ser considerado bioativo, o componente da dieta deve exercer um efeito biológico a um nível fisiológico e a bioatividade medida deverá ter potencial de afetar a saúde de maneira benéfica.

Peptídeos bioativos foram pesquisados principalmente no leite e derivados, como queijos ou iogurtes. No entanto, a sua existência foi observada em outras proteínas animais e vegetais, como soja, arroz, grão de bico e até mesmo em fungos. Vários peptídeos já foram isolados e caracterizados com inúmeras funções diferenciadas como atividade anticoagulante, imunomodulatória, antiviral, antitumoral, antiúlcera, anticoagulante, ergogênica, quelante de metais, hipercolesterômica e moduladora dos fatores de crescimento celular (VIOQUE et al, 2000; GOBETTI et al., 2002; CORRÊA, 2013).

A atividade antioxidante foi relatada em várias proteínas diferentes, tais como proteína de plasma suíno (Liu et al., 2010), proteína de soja (Chen et al., 1998) e proteína do ovo (Sakanaka et al., 2004) e revelaram que os peptídeos que exercem esta função possuem um tamanho de 2-20 aminoácidos e possuem massas moleculares de 6000 Da . Além disto, vários aminoácidos, como tirosina, metionina, histidina, lisina e triptofano são geralmente considerados como antioxidantes (JE et al., 2008).

Saito et al., (2009) apresentaram dados sobre a eficiência dos hidrolisados de colágeno e pele de salmão e truta sobre o perfil lipídico em ratos, diminuindo os lipídios totais e triglicerídeos em relação ao grupo controle. Wergedahl et al., (2004) mostraram que o hidrolisado protéico de salmão reduziu o colesterol total no plasma de ratos e aumentou a proporção de HDL- colesterol no fígado. Neste estudo os autores demonstraram que o hidrolisado proteico atuou como um nutriente cardioprotetor. Desta forma torna-se importante o desenvolvimento de hidrolisados proteicos a partir de matérias primas acessíveis e de custo inferior, e que possam ser utilizados em diferentes formulações, com os mais diferentes propósitos.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 Artigo 1

Artigo Científico no prelo aguardando para ser publicado na Revista **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina.

Utilização da carne mecanicamente separada de frango para a produção de hidrolisados proteicos a partir de diferentes enzimas proteolíticas

Uses of mechanically separated chicken meat for production from protein hydrolysates different proteolytic enzymes

Mari Silvia Rodrigues de Oliveira^{1*}; Felipe de Lima Franzen²; Nelcindo Nascimento Terra³

Resumo: A utilização de hidrolisados proteicos, oriundos de fontes animais e vegetais, em formulações específicas é uma área de crescente interesse. O objetivo deste trabalho foi desenvolver diferentes hidrolisados em pó com alto valor proteico, a partir da hidrólise enzimática de carne mecanicamente separada (CMS), um subproduto da indústria avícola, o qual pode ser uma fonte econômica para a produção destes hidrolisados. A matéria-prima utilizada foi a carne mecanicamente separada (CMS) de frango congelada adquirida de um abatedouro da região sul do Brasil. Antes da sua utilização a mesma foi descongelada sob temperatura de refrigeração e homogeneizada em um processador por 2 minutos. Foram utilizadas três enzimas comerciais Papaína[®], Flavourzyme[®] e Protamex[®]. A hidrólise ocorreu em banho termostatizado com temperatura, tempo e pH controlados. Foi realizada a composição proximal da matéria-prima e dos hidrolisados liofilizados, análises de controle da hidrólise como grau de hidrólise, teores de proteínas, sólidos totais, cinzas e caracterização de aminoácidos dos hidrolisados. Os resultados foram avaliados por análise de variância e teste de médias de Tukey. A hidrólise com a enzima Papaína apresentou o melhor comportamento, seguida da Protamex e da Flavourzyme. Os hidrolisados obtidos com a Papaína obtiveram maior teor proteico, de sólidos solúveis e menor teor de cinzas quando comparados com outros hidrolisados. A composição de aminoácido demonstra que o hidrolisado obtido da Papaína possui uma composição mais próxima da recomendada pelos órgãos de controle. Concluiu-se que os hidrolisados proteicos obtidos da carne mecanicamente separada de frango (CMS) apresentaram alto conteúdo proteico caracterizando-se como uma matéria prima promissora na formulação de dietas especiais.

Palavras-chave: Carne mecanicamente separada (CMS), hidrolisado protéico, hidrólise enzimática

Abstract: The use of hydrolyzed protein, derived from animal and vegetable sources, in specific formulations, is an area of growing interest. The aim of this study was to develop different powder hydrolysates with high protein value, from the enzymatic hydrolysis of mechanically deboned meat (MDM), a byproduct of the poultry industry, which can be a low-cost source for the production of these hydrolysates. The raw material used was frozen poultry mechanically deboned meat (MDM) purchased from an abattoir in southern Brazil. The raw material used was frozen poultry mechanically

¹ Professora Assistente da Universidade de Santa Cruz do Sul-UNISC e Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, RS. E-mail: mari@unisc.br

² Discente de Graduação do Curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, RS. E-mail: ffranzen2@gmail.com

³ Professor do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, RS. E-mail: nelcindoterra@gmail.com

* Autor para correspondência

deboned meat (MDM) purchased from an abattoir in southern Brazil. Before use, it was thawed under refrigeration and homogenized in a processor by 2 minutes. Three commercial enzymes were used, Papain, Protamex® and Flavourzyme®. The hydrolysis occurred in a thermostated bath with temperature, time and pH controlled. Proximal composition of the raw material and lyophilized hydrolysates, control analysis such as hydrolysis degree of hydrolysis, protein, total solids, ash and amino acid characterization of the hydrolysates were performed. The results were evaluated by analysis of variance and Tukey's averages test. The hydrolyzed obtained from the papain enzyme showed the best behavior, followed by Protamex and Flavourzyme. The hydrolysates from papain enzyme had higher protein content, soluble solids and lower ash content compared to other hydrolysates. The amino acid composition showed that the hydrolyzate from papain has a closer composition to what is recommended by the control organs. It was concluded that the protein hydrolysates obtained from mechanically deboned chicken had high protein content characterizing them as a promising raw material in the formulation of special diets.

Key words: Mechanically deboned meat (MDM), protein hydrolyzate; enzymatic hydrolysis

Introdução

A produção de carne de frango no Brasil chegou a 13,058 milhões de toneladas em 2011, um aumento de 6,8% em relação a 2010 (UBABEF, 2012). O consumo mundial de carnes aumentou principalmente nas duas últimas décadas, sendo este muito mais significativo em relação à carne de frango. Este acréscimo mundial de consumo foi mais evidente a partir dos anos 90 e várias razões podem ser citadas como explicação para este fenômeno, como por exemplo, a não existência de restrições religiosas ao seu consumo, preços mais baixos quando comparados as demais carnes, grande diversidade de produtos da cadeia produtiva e as características nutricionais desta carne que a tornam um produto essencial a saúde humana (MACHADO, 2007).

Neste contexto a preferência por cortes de frangos despertou a necessidade de encontrar meios para o aproveitamento de dorsos, pescoços e ossos resultantes da desossa. Dessa forma, a carne mecanicamente separada de aves (CMS) começou a ser utilizada na produção de inúmeros produtos como mortadelas, salsichas, salames e sopas em pó (TRINDADE; FELÍCO; CASTILHO, 2004).

A CMS segue os parâmetros do Regulamento Técnico que estabelece a Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Aves, Bovinos e Suínos, Regulamento este aprovado pela Instrução Normativa nº 4 de 31 de março de 2000 (BRASIL, 2000). Dentre estas a composição, as características físico-químicas e microbiológicas são as variáveis mais importantes e que contribuem para determinar as características e a qualidade da carne mecanicamente separada. Neste sentido inúmeros questionamentos surgiram quanto ao seu valor nutritivo, principalmente quanto aos níveis proteicos, de gordura e cálcio, além da estabilidade oxidativa e qualidade microbiológica desta matéria prima (TRINDADE; FELÍCO; CASTILHO, 2004, TRINDADE et al., 2008; PÛSSA et al., 2009).

A carne mecanicamente separada pode servir de fonte protéica para a obtenção de hidrolisados, área que tem despertado grande interesse industrial. Estes podem ser utilizados em formulações específicas tais como produtos geriátricos, suplementos energéticos, dietas para controle de peso ou terapêuticas (recém-nascidos prematuros, crianças com diarreia, gastroenterite, má-

absorção, fenilcetonúria e pessoas com alergia a proteínas) ou ainda dietas entéricas (AKYIAMA et al., 2006; BENITEZ; IBARZ; PAGAN, 2008).

Os hidrolisados protéicos podem ser obtidos basicamente por três métodos: a hidrólise alcalina, a hidrólise enzimática e a hidrólise ácida ou a combinação de dois ou mais destes métodos (ADLER-NISSEN, 1986; LAHL; BRAUN, 1994).

Segundo Spellman et al. (2003) a hidrólise enzimática possui algumas vantagens sob os outros métodos de hidrólise como o aumento da solubilidade, das propriedades emulsificantes dos hidrolisados e também o aumento da liberação de peptídeos biologicamente ativos de certas proteínas.

O uso de enzimas em processos industriais é de grande interesse, em especial devido à facilidade de obtenção (por biotecnologia) e às vantagens em relação aos catalisadores químicos, como maior especificidade, menor consumo energético e maior velocidade de reação. Além disso, a catálise enzimática tem outros benefícios, como o aumento da qualidade dos produtos, a redução dos custos de laboratório e de maquinário, visando com isto à melhoria ou a obtenção de produtos diferenciados na indústria alimentícia (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

Portanto o objetivo deste trabalho foi desenvolver diferentes hidrolisados em pó com alto valor proteico, a partir da hidrólise enzimática (Papaína, Flavourzyme® e Protamex®) de carne mecanicamente separada (CMS), um subproduto da indústria avícola, o qual pode ser uma fonte econômica para a produção destes hidrolisados.

Materiais e Métodos

Os experimentos foram todos realizados nos laboratórios do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria/RS (UFSM).

Material

A matéria-prima utilizada foi a carne mecanicamente separada (CMS) de frango congelada adquirida de um abatedouro da região sul do Brasil. Antes da sua utilização a mesma foi descongelada sob temperatura de refrigeração e homogeneizada em um processador (G. Paniz) por 2 minutos. As amostras apresentaram um pH médio de 6,42 durante o experimento.

Enzimas

Foram utilizadas três enzimas, a papaína comercialmente pura denominada Papain, From Papaya Látex-1,5 units/MG solid (Sigma Aldrich®), que é uma cisteína protease da família C1-peptidase. A papaína é composta por uma cadeia de polipeptídeo único com três pontes dissulfureto e um grupo sulfidrílico, necessários para a atividade da enzima. A papaína é uma enzima obtida do látex bruto do mamão. Foi utilizada também a Flavourzyme que é uma aminopeptidase produzida por fermentação submersa de uma linhagem selecionada do fungo *Aspergillus oryzae*, e utilizada para

hidrólise de proteínas sob condições neutras ou levemente ácidas. As condições ótimas relatadas para Flavourzyme1000L® são pH 7,0, com temperatura ótima em torno de 50 °C. A Flavourzyme1000 L® é uma exopeptidase com uma atividade de 1000 LAPU/g. Uma LAPU (Unidade Leucina Aminopeptidase) é a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de leucina- ρ -nitroanilida por minuto. A terceira enzima testada foi Protamex® que é uma enzima proteolítica produzida por fermentação submersa de *Bacillus licheniformes* e *Bacillus amyloliquefaciens* com atividade declarada de 1,5 AU-NH/g. As duas últimas enzimas mencionadas foram fornecidas pela Novozymes Latina Americana Ltda.

Composição proximal da matéria-prima e dos hidrolisados liofilizados

A composição centesimal da carne mecanicamente separada de frango (CMS) e dos diferentes hidrolisados obtidos foi determinada de acordo com a metodologia recomendada pela AOAC (1995). A quantidade de proteína presente foi definida pelo método de determinação de nitrogênio total, Kjeldahl ($N \times 6,25$); lipídios pelo método gravimétrico de extração a quente utilizando extrator de Soxhlet para a CMS e o método do Bligh e Dyer (1959) para o hidrolisado liofilizado; cinzas pelo método gravimétrico em mufla (550-600 °C) e o teor de umidade pelo método gravimétrico em estufa (105 °C). Também foram realizadas análises de sólidos totais, cinzas e proteínas de alíquotas de hidrolisados protéicos durante o processo de hidrólise.

Processo de obtenção do hidrolisado proteico

Condições de hidrólise

Para a realização do processo de hidrólise foram utilizadas 250 g de CMS/g ou mL de enzima acrescidas de 500 mL de água destilada (1:2) previamente aquecida e colocadas em banho termostático (Banho Ultratermostático Marconi modelo MA 184). As reações enzimáticas foram conduzidas à temperatura e pH de máxima atividade catalítica de cada enzima de acordo com a literatura e estão descritas na Tabela 1 (OGAWA; MAIA, 1999; CÂNDIDO; SGARBIERI, 2003). O pH das enzimas Flavourzyme e Protamex foram ajustados com solução de fosfato de sódio 0,2 M. Durante a hidrólise as amostras e as enzimas foram continuamente agitadas com agitador mecânico (Agitador Marconi modelo MA 039) durante todo o tempo de hidrólise (120 minutos).

Durante a hidrólise da CMS caldos de amostras foram coletados nos tempos de 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos de hidrólise. Todos os hidrolisados coletados foram filtrados em uma tela plástica com abertura de malha de 10 mesh, filtrados novamente em uma gaze e depois centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos em uma centrífuga (Cetribio-Servilab) para remover todas as partículas sólidas (fundo) e a gordura (camada superior).

A proteína hidrolisada foi então aquecida a 95°C por no mínimo 15 minutos para inativar a enzima, em seguida foi esfriada a temperatura ambiente, congelada e então liofilizada a uma

temperatura de -54°C em liofilizador (LD 1500 Terroni).

Tabela 1. Sistemas enzimáticos de hidrólise.

Enzimas	[E]:[S] ^a	pH ^b	T°C ^c	Tempo (min.) ^d
Papaína	1:250	6,5	60	120
Flavourzyme	1:250	7,0	50	120
Protamex	1:250	7,0	50	120

^aRelação Enzima/Substrato (p/p); ^bpH ótimo de ação das enzimas; ^cTemperatura ótima de ação das enzimas; ^dTempo total de hidrólise

Fonte: Elaboração dos autores.

Determinação do Grau de Hidrólise (GH)

Alíquotas de hidrolisado durante os tempos indicados foram retiradas e a reação foi inativada com adição de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Após repouso de 10 minutos e filtração para a remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA as proteínas solúveis foram quantificadas pelo método de Lowry et al. (1951), expresso em mg de albumina. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro (Modelo SP-220–Biospectro) a 650 nm. O grau de hidrólise foi medido segundo método descrito por Hoyle e Merrit (1994) e por Liceaga-Gesualdo e Li-Chan (1999), sendo expresso como percentagem de proteínas solúveis no TCA em relação à quantidade de proteína inicial total, e calculado em mg/g, segundo a Equação 1.

$$GH = \frac{\text{Proteína Solúvel em 10\% TCA} \times 100}{\text{Proteína Total da Amostra}} \quad (1)$$

Determinação dos aminoácidos dos hidrolisados protéicos

As proteínas constituintes das amostras foram hidrolisadas com HCl 6N durante 24 horas a 110 °C. Os aminoácidos liberados durante a hidrólise ácida reagem com Fenil-isotilcianato (PITC), separados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa e detectados por ultravioleta (UV). A quantificação foi feita por calibração interna multinível segundo a metodologia descrita por LAMIC (2012).

Análise estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente mediante a Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si através do teste de Tukey ao nível de 5% de significância pelo Sistema IBM® SPSS® Statistics (Versão 20).

Resultados e Discussão

Composição proximal da matéria-prima utilizada na hidrólise e dos hidrolisados liofilizados

A Tabela 2 demonstra as características da matéria prima utilizada no experimento, estes valores são semelhantes aos relatados na literatura para carne mecanicamente separada.

Tabela 2. Média da composição centesimal e valor calórico da carne mecanicamente separada (CMS) utilizadas no experimento.

Determinações (bu,%)	Carne Mecanicamente Separada (CMS)
Umidade	67,72± 0,52
Cinzas	1,08 ± 0,05
Lipídeos	18,36 ± 0,50
Proteínas	11,89 ± 0,20
Carboidratos	1,57± 0,27
Valor calórico (Kcal/100g)	216,60 ± 4,81

Fonte: Elaboração dos autores.

Os limites oficiais sobre a qualidade físico-química da CMS são descritos no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Aves, Bovinos e Suínos anexo à Instrução Normativa nº4 (BRASIL, 2000), o qual estabelece alguns dos parâmetros de qualidade como 30% de lipídios totais no máximo e de 12% de proteínas no mínimo. Os valores de cinzas e umidade estão de acordo com os valores apresentados por Gonçalves et al. (2009) para esta matéria-prima e são mais altos do que os encontrados por Daros, Masson e Amico (2005) em CMS de frango. As cinzas e umidade não possuem valores padrões estabelecidos para CMS na legislação vigente, sendo os dados deste trabalho, como outros semelhantes na literatura, importantes referências para a padronização desses parâmetros.

A composição centesimal dos hidrolisados obtidos pela hidrólise enzimática está apresentada na Tabela 3. O teor de umidade foi significativamente diferente ($p < 0,05$) entre os hidrolisados obtidos que variaram de 3,58 a 8,13%. Estes teores diferem do valor encontrado (6,92%) por Rossi (2007), para um hidrolisado de carne mecanicamente separada de frango obtido por hidrólise com a enzima Alcalase 2.4 L FG. O teor de umidade pode ser influenciado pela metodologia de secagem na obtenção do hidrolisado. Os valores apresentados estão adequados para produtos em pó tipo farinha, cuja legislação permite umidade máxima de 15% (BRASIL, 2005).

A composição química do hidrolisado obtido com a papaína assemelhou-se dos resultados obtidos por Fonkwe e Singh (1996), que obtiveram aproximadamente 78% de proteínas e 9,1% de umidade, neste experimento o teor de lipídeos foi bem menor (5,7%), já que a matéria-prima utilizada foi o resíduo da carne mecanicamente separada de peru. O teor de lipídeos não variou entre os hidrolisados obtidos com a Flavourzyme e Protamex, mas estes foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) do hidrolisado obtido com a papaína, porém todos se apresentaram menores que o teor de lipídeos da matéria-prima inicial (CMS). De acordo com Nilsang et al. (2005), com o processo de centrifugação uma parte dos lipídeos é excluída juntamente com as proteínas insolúveis, o que pode aumentar a estabilidade durante o armazenamento do hidrolisado.

A elevada concentração de cinzas para os hidrolisados obtidos com a enzima Flavourzyme e a Protamex, justifica-se pelo ajuste do pH no início do processo de hidrólise, o que não ocorreu com o

hidrolisado obtido com a Papaína já que a CMS utilizada apresentava o pH adequado de ação desta enzima que é entre de 5,0-8,0 (BENITEZ; IBARZ; PAGAN, 2008).

Tabela 3. Composição centesimal dos hidrolisados protéicos de CMS liofilizados, obtidos através da hidrólise com diferentes enzimas.

Enzima	Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídeos (%)	Proteína (%)	Valor CAL (Kcal/100g)
Papaína	4,70 ^b ±0,69	5,08 ^c ±0,06	10,34 ^a ±0,77	77,81 ^a ±1,80	412,55 ^a ±3,81
Flavourzyme	8,13 ^a ±0,03	12,20 ^a ±0,16	8,45 ^b ±0,55	70,20 ^b ±1,01	360,93 ^c ±3,24
Protamex	3,58 ^c ±0,04	10,38 ^b ±0,03	7,28 ^b ±0,26	78,55 ^a ±0,15	380,53 ^b ±1,18

Médias dentro da mesma coluna, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaboração dos autores.

Os teores de proteínas dos hidrolisados obtidos com a Papaína e com a Protamex não diferiram estatisticamente, porém o teor de proteínas do hidrolisado obtido com a Flavourzyme apresentou-se menor e diferiu ($p < 0,05$) de ambos. Os teores de proteínas apresentaram-se dentro dos valores relatados em estudos que indicam como matéria prima cabeças e carne mecanicamente separada de frango (SALES et al., 1991; SURÓWKA; FIK, 1994; SOARES et al., 2000).

Determinação do Grau de Hidrólise (GH)

A extensão da degradação das proteínas pelas enzimas proteolíticas foi estimada pela medida do grau de hidrólise, que é um parâmetro para comparar diferentes hidrolisados (ADLER-NISSEN, 1986; MAHMOUD; MALONE; CORDLE, 1992; LAHL; BRAUN, 1994; MAHMOUD, 1994). A Tabela 4 apresenta os dados relacionados ao grau de hidrólise. No final da hidrólise (120 minutos) observam-se valores de 66%, 29% e 61% de GH para a Papaína, Flavourzyme e Protamex, respectivamente. Com o mesmo substrato e a mesma quantidade de enzima, o GH apresentado pela Papaína e a Protamex não diferiu estatisticamente ($p < 0,05$), já a Flavourzyme apresentou menor GH que as demais. Os níveis elevados de grau de hidrólise para a Papaína e Protamex sugerem que estas têm maior afinidade pelo substrato e, portanto são mais eficientes que a Flavourzyme.

Charoenphun et al. (2013) obtiveram após 6 horas de hidrólise de tilápia (*Oreochromis niloticus*) com diferentes enzimas, entre elas a Papaína e a Flavourzyme, graus de hidrólise de 41,6% e 35,6%, respectivamente. Mesmo utilizando matérias-primas diferentes o resultado para a Papaína assemelha-se muito com o encontrado neste estudo, indicando que talvez não fosse necessário um tempo tão longo de hidrólise para esta protease, porém os resultados apresentados para a Flavourzyme foram extremamente maiores indicando que esta exopeptidase necessita de um tempo maior para obterem-se melhores resultados de hidrólise para esta enzima.

Segundo Slizyte et al. (2005) o processo de hidrólise pode ser influenciado negativamente pelo teor de lipídeos, pela formação de complexos proteína/lipídeos, mais resistentes ao rompimento

enzimático. Estes autores ao analisarem a composição de diferentes frações obtidas após a hidrólise de bacalhau (*Gadusmorhua*) com as enzimas Flavourzyme e Neutrase observaram que matérias-primas com elevado conteúdo de lipídeos resultavam em um hidrolisado com menor quantidade de proteína solubilizada.

Schmidt e Salas Mellado (2009) observaram que o grau de hidrólise era menor quando o substrato utilizado (coxa e peito de frango) possuía maior teor de lipídeos e também de colágeno e que este fato era mais evidente com a enzima Flavourzyme do que com a Alcalase.

Hoyle e Merritt (1994) encontraram valores de grau de hidrólise que variaram de 23,84% a 43,14% em um estudo com arenque cru e um bolo prensado de arenque, respectivamente utilizando como enzima a Papaína durante 60 minutos, a 60-65°C e com pH 6,0-7,0.

A enzima Flavourzyme foi utilizada por Cândido e Sgarbieri (2003) na hidrólise de proteínas de tilápia do Nilo (*Oreochromusniloticus*) em condições de pH e temperaturas semelhantes (pH 7 a 50 °C) as utilizadas neste estudo, porém com concentrações de substrato e enzima diferenciadas, (12% de substrato e 1% de enzima) e obtiveram valores de GH na faixa de 2,5 a 45%.

Tabela 4. Grau de hidrólise apresentado durante as duas horas de hidrólise para as diferentes enzimas utilizadas em condições estabelecidas de pH e temperatura.

Enzimas	Tempo de Hidrólise (minutos)						
	5'	15'	30'	45'	60'	90'	120'
Papaína	47,01 ^{a±}	50,93 ^{a±}	54,63 ^{a±}	58,77 ^{a±}	57,93 ^{a±}	62,36 ^{a±}	66,20 ^{a±}
	10,80	9,23	6,11	7,56	5,88	5,51	2,76
Flavourzyme	13,09 ^{b±}	22,52 ^{b±}	22,17 ^{b±}	23,68 ^{b±}	24,67 ^{b±}	26,84 ^{b±}	29,46 ^{b±}
	5,60	3,56	4,36	3,48	3,82	5,93	4,78
Protamex	27,50 ^{b±}	40,51 ^{a±}	48,95 ^{a±}	53,99 ^{a±}	54,70 ^{a±}	54,72 ^{a±}	61,21 ^{a±}
	4,18	2,13	7,07	8,99	8,50	8,74	4,34

Médias dentro da mesma coluna, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Fonte: elaboração dos autores.

O grau de hidrólise obtido pela Papaína foi semelhante aos resultados obtidos por Fonkwe e Singh (1996) que utilizando as mesmas condições de hidrólise para um substrato diferente (resíduos de carne mecanicamente separada de peru) apresentaram um grau de hidrólise entre 65-70%, demonstrando com isto a eficiência hidrolítica desta enzima.

Para a Flavourzyme e a Protamex não ocorreu um aumento significativo após os 45 minutos de hidrólise, este comportamento pode estar associado a diversos fatores, tais como: (1) diminuição da concentração de ligações peptídicas disponíveis para a hidrólise; (2) competição entre o substrato original e os peptídeos formados durante a reação; (3) diminuição da atividade enzimática, devido à desnaturação da enzima e também pela inibição pelos produtos gerados durante a hidrólise (ADLERNISSEN, 1986; MORENO; CUADRADO, 1993; GONZÁLEZ-TELLO et al., 1994; GUERARD; GIMAS; BINET, 2002).

Determinação do teor de Proteínas Solúveis, Sólidos Totais e Cinzas durante o tempo de hidrólise

Os valores de conteúdo proteico (Tabela 5) para a Papaína não variaram significativamente ($p < 0,05$) entre os diferentes tempos de hidrólise, já para a enzima Flavourzyme os tempos 5, 15 e 45 minutos de hidrólise diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) do tempo final de 120 minutos, ressaltando a exigência da enzima por um tempo maior de atuação. O teor de proteínas para os hidrolisados obtidos com a Protamex aumentaram significativamente a partir dos 45 minutos de hidrólise e mantiveram-se constantes até o final desta.

Percentuais de 0,7% a 1,5% de papaína foram utilizadas por Sales e colaboradores (1991) em um estudo sobre extração enzimica de proteína de resíduo de carne mecanicamente separada que produziu 83% de recuperação proteína.

Tabela 5. Teor de proteínas dos hidrolisados obtidos de carne mecanicamente separada de frango durante o tempo de hidrólise de 120 minutos com diferentes enzimas.

Tempo de Hidrólise (minutos)	Enzimas (% Proteínas)		
	Papaína	Flavourzyme	Protamex
5'	71,45 ^a ±9,76	54,26 ^b ±2,44	58,82 ^b ±7,58
15'	71,50 ^a ±9,11	57,48 ^b ±3,60	59,07 ^b ±7,41
30'	74,77 ^a ±9,24	59,07 ^{ab} ±4,53	62,52 ^{ab} ±6,00
45'	74,24 ^a ±7,19	57,54 ^b ±4,73	66,37 ^a ±2,97
60'	66,11 ^a ±15,30	58,95 ^{ab} ±2,89	69,65 ^a ±3,27
90'	71,46 ^a ±12,26	59,20 ^{ab} ±2,59	68,70 ^a ±2,21
120'	71,28 ^a ±12,60	62,91 ^a ±4,23	69,63 ^a ±2,49

Médias dentro da mesma coluna, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaboração dos autores.

A Tabela 6 apresenta o teor de sólidos solúveis dos experimentos realizados com as diferentes enzimas. O teor de sólidos solúveis totais variou significativamente ($p < 0,05$) no tempo de 120 minutos de hidrólise com as três enzimas utilizadas neste estudo. Os valores de sólidos solúveis encontrados com a Papaína e a Protamex foram maiores do que os valores citados por Stabile (1991), que ao determinar as condições ideais da hidrólise da proteína de carne com suco de abacaxi (carne/suco 1:1) obteve valores de sólidos de 7,6 g/100g, já a Flavourzyme apresentou ao final do experimento valor de 7,17g/100g de sólidos solúveis totais. Diferentemente Fonkwe e Singh (1996) informaram que os valores de sólidos totais na solução de hidrólise com a Papaína em carne mecanicamente separada de peru não variou significativamente após 30 minutos de hidrólise.

Tabela 6. Percentual de sólidos solúveis dos hidrolisados obtidos de carne mecanicamente separada de frango durante o tempo de hidrólise de 120 minutos com diferentes enzimas.

Tempo de Hidrólise (minutos)	Enzimas (% de Sólidos Solúveis)		
	Papaína	Flavourzyme	Protamex
5'	6,28 ^b ±1,21	4,88 ^c ±0,95	7,47 ^b ±1,52
15'	6,36 ^b ±0,61	4,73 ^c ±0,62	6,63 ^b ±0,78
30'	6,70 ^b ±0,67	5,73 ^{bc} ±0,73	6,55 ^b ±0,65
45'	7,06 ^b ±0,53	6,34 ^{ab} ±1,36	7,27 ^b ±1,27
60'	7,14 ^b ±0,43	5,69 ^{bc} ±0,51	7,01 ^b ±0,42
90'	8,27 ^{ab} ±1,07	6,73 ^{ab} ±0,80	7,31 ^b ±0,19
120'	10,00 ^a ±3,11	7,18 ^a ±0,98	8,80 ^a ±0,38

Médias dentro da mesma coluna, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaboração dos autores.

A Tabela 7 apresenta os resultados encontrados para cinzas dos hidrolisados no decorrer do tempo de hidrólise. O menor teor de cinzas ocorreu para o hidrolisado obtido a partir da Papaína, já que o pH não necessitou de ajustes, enquanto que com a Flavourzyme e a Protamex o ajuste de pH influenciou aumentando significativamente ($p < 0,05$) estes valores.

Tabela 7. Percentual de cinzas dos hidrolisados obtidos de carne mecanicamente separada de frango durante o tempo de hidrólise de 120 minutos com diferentes enzimas.

Enzimas	Tempo de Hidrólise (minutos) / % de cinzas						
	5'	15'	30'	45'	60'	90'	120'
Papaína	5,67 ^b ±	5,71 ^b ±	5,19 ^c ±	5,71 ^c ±	5,29 ^c ±	5,04 ^c ±	5,13 ^c ±
	0,94	0,93	0,73	1,47	0,66	0,76	0,92
Flavourzyme	10,60 ^a ±	10,13 ^a ±	9,42 ^b ±	7,98 ^b ±	8,52 ^b ±	8,50 ^b ±	7,97 ^b ±
	1,57	1,01	0,62	1,65	0,65	1,01	0,65
Protamex	9,27 ^a ±	11,27 ^a ±	11,47 ^a ±	11,27 ^a ±	10,86 ^a ±	9,50 ^a ±	10,20 ^a ±
	1,89	1,46	1,61	2,18	1,35	0,65	1,33

Médias dentro da mesma coluna, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaboração dos autores.

Martins, Costa e Prentice-Hernández (2009), em um estudo sobre a obtenção de hidrolisado proteico de pescado obtido por via química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*) detectaram que o conteúdo de cinzas nos isolados ácido e alcalino foi menor que 1%, enquanto nos hidrolisados enzimáticos esses valores foram de 12,98% para a Flavourzyme e 16,84% para a Alcalase, valores semelhantes aos encontrados neste trabalho para a Flavourzyme e Protamex.

Neves, Mira e Marquez (2004), trabalhando com dois *minced* de pescado, um produzido com a mistura de duas espécies de água salgada – Maria Luíza (*Paralichthys brasiliensis*) e Perna-de-

Moça (*Cynoscion*sp) e outro produzido com Camarão-rosa (*Penaeus brasiliensis* e *Penaeus pauliensis*) submetido às proteases observaram um aumento dos valores de cinzas nos hidrolisados de 10,7% a 18,7% e atribuíram estes índices a formação de NaCl em razão do ajuste do pH durante a hidrólise enzimática das proteínas.

A Tabela 8 apresenta o teor de aminoácidos presentes nos três hidrolisados e pode-se observar que a Papaína produz um hidrolisado com maior teor de aminoácidos essenciais quando comparado com as outras enzimas utilizadas no experimento. Esta mesma tabela compara os valores obtidos com os preconizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para crianças de 2 a 5 anos e para adultos e pode-se visualizar que a enzima que proporciona maior quantidade de aminoácidos equivalendo-se as recomendações é a papaína.

O teor de aminoácidos apresentado pelo hidrolisado produzido a partir da hidrólise da CMS com a Papaína assemelha-se com os resultados divulgados no trabalho de Rossi et al. (2009), no qual estes autores avaliaram biologicamente o hidrolisado protéico obtido de carne de galinha desossada mecanicamente.

Tabela 8. Composição de aminoácidos dos hidrolisados obtidos com diferentes enzimas a partir de carne mecanicamente separada de frango (CMS) em comparação as recomendações da FAO.

Aminoácidos (mg/g)	Enzimas				
	Papaína	Flavourzyme	Protamex	FAO (2-5anos)	FAO (adultos)
Não essenciais					
Ácido aspártico	71,6	42,4	47,7	-	-
Ácido glutâmico	109,7	76,4	77,9	-	-
Serina	28,8	17,1	19,8	-	-
Glicina	37,9	18,6	23,7	-	-
Arginina	49,6	29,9	33,8	-	-
Treonina	31,1	12,5	18,1	34	5
Alanina	44,3	24,8	27,6	-	-
Prolina	33,9	17,0	21,3	-	-
Essenciais					
Histidina	24,7	19,8	19,6	19	16
Tirosina	24,9	12,2	15,4	-	-
Valina	37,7	20,7	23,9	35	13
Metionina	36,6	13,7	16,8	24*	17*
Cistina	1,20	1,00	1,00	-	-
Isoleucina	33,7	17,0	22,7	28	13
Leucina	62,4	35,8	41,5	66	19
Fenilalanina	40,8	25,2	25,2	63**	19**
Lisina	79,6	55,3	56,9	58	16
Triptofano	-	-	-	11	9

*Dados que somam metionina+cistina;**dados que somam fenilalanina+tirosina- FAO: Food and Agriculture Organization (1985).

Fonte: Elaboração dos autores.

Segundo Kurozawa, Park e Hubinger (2008) a proteína de carne de frango tem um equilíbrio perfeito de aminoácidos essenciais, o que a torna um bom substrato para a produção de hidrolisados. Os hidrolisados proteicos geralmente são aplicados na gestão nutricional de indivíduos que não conseguem digerir a proteína completa, ou seja, intacta. Normalmente proteínas extensamente hidrolisadas demonstram uma redução da atividade imunológica caracterizando-se como um ingrediente de formulações para pessoas hiperalérgicas, além de fonte de nitrogênio para a nutrição esportiva e suplementos para uma grande variedade de dietas (MAHMOUD, 1994; SLIZYTE et al., 2005; BHASKAR et al., 2007).

Conclusões

Os hidrolisados proteicos obtidos da carne mecanicamente separada de frango (CMS) apresentaram alto conteúdo proteico caracterizando-se como uma matéria prima promissora na formulação de dietas especiais. Obteve-se hidrolisados com diferentes valores de grau de hidrólise, a enzima Papaína apresentou o melhor comportamento, seguida da Protamex e da Flavourzyme. Os hidrolisados obtidos com a Papaína obtiveram maior teor proteico, de sólidos solúveis e menor teor de cinzas quando comparados com outros hidrolisados. A composição de aminoácido demonstra que o hidrolisado obtido da Papaína possui uma composição mais próxima da recomendada pelos órgãos de controle.

Referências

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. *Official methods of analysis*. 16th ed. Horowitz: Washington D.C., 1995.

ADLER-NISSEN, J. Enzimic hydrolysis of food proteins. *Elsevier applied science*. Barking: Elsevier Applied Science, 1986. 427 p.

AKIYAMA, H.; SAKATA K.; YOSHIOKA Y.; MURATA Y.; ISHIHARA Y.; TESHIMA R.; SAWADA J.; MAITANI T. Profile analysis and immunoglobulinand reactivity of wheat protein hydrolysates. *International Archives of Allergy and Immunology*, Basel, v. 140, n. 1, p. 36-42, 2006.

BENÍTEZ, R.; IBARZ, A.; PAGAN, J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. Argentina, v. 42, n. 2, p. 227-36, 2008.

BHASKAR, N.; MODI, V. K.; GOVINDARAJU, K.; RADHA, C.; LALITHA, R. G.; Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. *Bioresource Technology*, England, v. 98, n. 2, p. 388-394, 2007.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*., Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-7, 1959.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada (CMS) de aves, bovinos e suínos. *Diário Oficial*, Brasília, 05 abr. p.6-7. Instrução Normativa, 4 - Anexo 1, 2000.

_____. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 8, 03 jun. 2005. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Farinha de Trigo. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 03 jun. 2005, Seção 1, n. 105, p. 91.

CÂNDIDO, L. M. B.; SGARBIERI, V. C. A hidrólise enzimática de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) proteínas miofibrilares: efeitos sobre propriedades nutricionais e hidrofílico. *J. Sci. Food Agric.*, London, v. 83, n. 10, p. 937-944, 2003.

CHAROENPHUN, N.; CHEIRSILP, B.; SIRINUPONG, N.; YOURAVONG, W. Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. *Eur Food Res Technol.*, Germany, v. 236, n.1, p. 57-63, 2013.

DAROS, F. G.; MASSON, M. L.; AMICO, S. C. The influence of the addition of mechanically deboned poultry meat on the rheological properties of sausage. *Journal of Food Engineering*, Westport, v. 68, n. 2, p. 185-189, 2005.

FONKWE, L. G.; SINGH, R. K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. *Process Biochemistry*, Watford, v. 31, n. 6, p. 605-616, 1996.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION- FAO/WHO. Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/ UNU Expert Consultation. World Health Organization. Geneve: World Health Organization, 1985.

GONÇALVES, R. M.; GONÇALVES, J.R.; GONÇALVES, R. M.; OLIVEIRA, R. R.; OLIVEIRA, R. A.; LAGE, M.E. Avaliação físico-química e conteúdo de metais pesados em carne mecanicamente separada (CMS) de frango e de bovino produzidas no estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v. 10, n. 2, p. 553-559, abr./jun. 2009.

GONZÁLES-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PAEZ, M. P.; GUADIZ, E. M. Enzymatic hydrolysis of whey protein. I. Kinetic models. *Biotechnology and Bioengineer*, United States, v. 44, n. 4, p. 523-528, 1994.

GUERARD, F.; GUIMAS, L.; BINET, A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B; Enzymatic*, Netherlands, v. 870, n. 19-20, p. 489-498, 2002.

HOYLE, N. T.; MERRIT, J. H. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, Chicago, v. 59, n. 1, p. 76-79, 1994.

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 73, n. 5, p. 405-412, 2008.

LABORATÓRIO DE ANÁLISES MICOTOXICOLÓGICAS - LAMIC. Universidade Federal de Santa Maria: Santa Maria, 2012.

LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technology*, Chicago, v. 48, n. 10, p. 68-71, 1994.

- LICEAGA-GESUALDO, A. M.; LI-CHAN, E. C. Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*clupea harengus*). *Journal of Food Science*, Chicago, v. 64, n. 6, p. 1000-1004, 1999.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MACHADO, D. D. G. *Cadeia produtiva da avicultura-situação e perspectivas*. Brasil: IICA-Instituto Interamericano de Cooperação para Agricultura, 2007. 142 p. (Informe Agronegócio, 3).
- MAHMOUD, M. I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technology*, Chicago, v. 48, n. 10, p. 89-95, 1994.
- MAHMOUD, M. I.; MALONE, W. T.; CORDLE, C. T. Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 57, n. 5, p. 1223-1229, 1992.
- MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por via química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). *Química Nova*, Brasília, v. 32, n. 1, p. 61-66, 2009.
- MORENO, M. C. M.; CUADRADO, V. F. Enzymic hydrolysis of vegetables proteins: mechanism and kinetics. *Process Biochemistry*, Watford, v. 28, n. 7, p. 481-490, 1993.
- MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Biotecnologia - enzimas ferramentas na indústria. *Ciência Hoje*, Rio de Janeiro, v. 41, n. 242, out. 2007.
- NEVES, R. A. M.; MIRA, N. V. M.; MARQUEZ, U. M. L. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 24, n. 1, p. 101-108, 2004.
- NILSANG, S.; LERTSIRI, S.; SUPHANTHARIA, M.; ASSAVANIG, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of Food Engineering*, Westport, v. 70, n.4, p. 571-578, 2005.
- OGAWA, N. B. P.; MAIA, E. L. *Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado*. São Paulo: Varela, 1999. 430 p.
- PÜSSA, T.; RAUDSEPP, P.; TOOMIK, P.; PÄLLIN, R.; MÄEORG, U.; KUUSIK, S.; SOIDLA, R.; REI, M. Study of oxidation products of free polyunsaturated fatty acids in mechanically deboned meat. *Journal of Food Composition and Analysis*, United States, v. 22, n.4, p. 307-314, 2009.
- ROSSI, D. M. *Utilização de carne mecanicamente separada de frango para produção de um hidrolisado proteico a partir de enzimas microbianas*. 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- ROSSI, D. M.; FLÔRES, S. H.; VENZKE, J. G.; AYUB, M. A. Z. Biological evaluation of mechanically deboned chicken meat protein hydrolysate. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 22, n. 6, p. 879-885, nov./dez. 2009.
- SALES, A. M.; CARVALHO, A. C. V.; BALDINI, V. L. S.; GONÇALVES, J. R.; BERAQUET, J. N. Extração enzimática de proteína de resíduo de carne de frango mecanicamente separada. *Coletânea Ital*, Campinas, v. 21, n. 2, p. 223-242, 1991.
- SCHMIDT, C. G.; SALAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas Alcalase e Flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. *Química Nova*, Brasília, v. 32, n. 5, p. 1144-

1150, 2009.

SLIZYTE, R.; DAUKSAS, E.; FALCH, E.; STORRO, I.; RUSTAD, T. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by products. *Process Biochemistry*, London, v. 40, n. 3-4, p. 1415-1424, 2005.

SOARES, L. H. B.; MARQUES, D. N.; ALBUQUERQUE, P. M.; AYUB, M. A. Z. Influence of some commercial proteases and enzymatic associations on the hydrolytic solubilization of deboned poultry meat proteins. *Food Science and Technology International*, London, v. 6, n. 4, p. 301-306, 2000.

SPELLMAN, D.; McEVOY, E.; O'CUINN, G.; FITZGERALD, R. J. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: comparison of tnbs, opa and ph stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, Barking, v. 13, n. 6, p. 447-453, 2003.

STABILE, M.N.O. Otimização do processo biotecnológico de hidrólise de carne bovina, Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1991.

SURÓWKA, K.; FIK, M. Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. I. Application of pepsin to the production of protein hydrolysate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 65, n. 3, p. 289-296, 1994.

TRINDADE, M. A.; NUNES, T. P.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J.; FELÍCIO, P. E. Estabilidade oxidativa e microbiológica em carne de galinha mecanicamente separada e adicionada de antioxidantes durante período de armazenamento a -18 °C. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28, n. 1, p. 160-168, jan./mar, 2008.

TRINDADE, M. A.; FELÍCIO, P. E.; CASTILHO, C. J. C. Mechanically separated meat of broilers breeder and white layer spent hens. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 61, n. 2, p. 234-239, 2004.

UBABEF - União Brasileira de Avicultura. Relatório anual-2012. São Paulo: UBABEF, 2012.

4.2 Artigo 2

Em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à revista

Brazilian Journal of Food Technology, Campinas.

(configurado conforme as normas da revista)

Utilização de enzimas proteolíticas para produção de hidrolisados protéicos a partir de carcaças de frango manualmente desossadas

Utilização de enzimas proteolíticas para produção de hidrolisados protéicos a partir de carcaças de frango manualmente desossadas

Use of proteolytic enzymes for the production of hydrolyzed proteins from chicken carcasses manually boned

Mari Silvia Rodrigues de Oliveira^{I,*}; Felipe de Lima Franzen^{II}; Nelcindo Nascimento Terra^{III}; Ernesto Hashime Kubota^{IV};

^IUniversidade de Santa Cruz do Sul (UNISC) Departamento de Química e Física Santa Cruz do Sul /RS – Brasil Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria/RS – Brasil e-mail: mari@unisc.br

^{II}Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) Curso de Agronomia Santa Maria /RS – Brasil e-mail: ffranzen2@gmail.com

^{III}Universidade de Santa Maria (UFSM) Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos Santa Maria /RS - Brasil. e-mail: nelcindoterra@gmail.com

^{IV}Universidade de Santa Maria (UFSM) Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos Santa Maria /RS - Brasil. e-mail: ernehk2008@yahoo.com.br

* Autor para correspondência.

RESUMO

O emprego de hidrolisados proteicos, oriundos de fontes animais e vegetais, em formulações específicas é uma área de crescente interesse. O objetivo deste trabalho foi desenvolver diferentes hidrolisados liofilizados com alto valor proteico, a partir da hidrólise enzimática de carcaças manualmente desossadas (CMD) de frango, um subproduto da indústria avícola, que normalmente é utilizado para a fabricação de carne mecanicamente separada (CMS). A matéria-prima utilizada foi a carcaça manualmente desossada (CMD) de frango congelada, obtida de animais abatidos com aproximadamente 42 dias e com peso médio de 2,5 kg, adquirida de um abatedouro da região sul do Brasil. Antes da sua utilização, a mesma foi

descongelada sob temperatura de refrigeração e cortada em pedaços menores com faca de aço inox para facilitar sua homogeneização durante o tempo de hidrólise. Foram utilizadas três enzimas comerciais Papaína[®], Flavourzyme[®] e Protamex[®]. A hidrólise ocorreu em banho termostaticado com temperatura, tempo e pH controlados. Foi realizada a composição proximal da matéria-prima e dos hidrolisados liofilizados, análises de controle da hidrólise como grau de hidrólise, teores de proteínas, sólidos totais, cinzas, caracterização de aminoácidos dos hidrolisados, atividade de água, rendimento, percentual de hidrólise e cor dos hidrolisados. Os resultados foram avaliados por análise de variância e teste de Tukey para comparação de médias. O grau de hidrólise foi maior com a Protamex seguida da Papaína e da Flavourzyme. O teor de proteínas após os 120 minutos de hidrólise não variou estatisticamente ($p < 0,05$) entre a Papaína e a Flavourzyme. A composição de aminoácido demonstra que o hidrolisado obtido da Papaína possui uma composição mais próxima da recomendada pelos órgãos de controle. Concluiu-se que os hidrolisados proteicos obtidos da carcaça manualmente desossada (CMD) de frango apresentaram alto conteúdo proteico caracterizando-se como uma matéria prima promissora na formulação de dietas especiais.

Palavras-chave: Carcaça de frango manualmente desossada (CMD) de frango; hidrolisado protéico; hidrólise enzimática.

Summary

The use of protein hydrolysates, derived from animal and vegetable sources, in specific formulations is an area of growing interest. The goal of this paper was to develop different lyophilized powder hydrolysates with high protein value, from the enzymatic hydrolysis of manually deboned chicken carcass (MDC), a byproduct of the poultry industry, which is normally used in the production of mechanically separated meat (MSM). The raw material used was frozen manually deboned chicken carcass (MDC), obtained from animals slaughtered with approximately 42 days and average weight of 2.5 kg, obtained from an abattoir in southern Brazil, before using, it was thawed under refrigeration, and cut into smaller pieces with a stainless steel knife for easy mixing during the hydrolysis time. Three commercial

enzymes, Papain[®], Flavourzyme[®] and Protamex[®] were used. Hydrolysis occurred in thermostatic bath with controlled temperature, time and pH. Proximal composition of the raw material and lyophilized hydrolysates was performed, control analysis of the hydrolysis, such as degree of hydrolysis, protein, total solids, ash, characterization of hydrolyzed amino acids, water activity, income, percentage hydrolysis and color hydrolysates were also performed. The results were evaluated by analysis of variance and Tukey test for mean comparison. The degree of hydrolysis was higher with Papain, followed by Protamex and Flavourzyme. The protein content after 120 minutes of hydrolysis was not significantly different ($p < 0.05$) between Papain and Flavourzyme. The amino acid composition showed that the hydrolyzate obtained by papain has a composition closer to what is recommended by the control authorities. It was concluded that protein hydrolysates obtained from manually deboned chicken carcass (MDC) had high protein content, characterizing it as a promising raw material in the formulation of special diets.

Keywords: Manually deboned chicken carcass (MDC), protein hydrolyzate, enzymatic hydrolysis

1 Introdução

O crescimento da demanda global de carne de frango devido ao aumento da renda *per capita* da população mundial e da mudança de hábitos e preferências alimentares dos consumidores, impulsiona as melhorias do processo produtivo visando além do aumento da produtividade, produtos de melhor qualidade (MAPA, 2011).

Desta forma a comercialização e o consumo de cortes de carne de frango no Brasil têm aumentado visivelmente, devido a sua atratividade e praticidade. Neste contexto, as indústrias nacionais processadoras de carne de frango procuraram se estruturar e se adequar ao mercado externo. Além disso, a Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (MAPA) criou normas para padronizar as atividades de corte nos abatedouros-frigoríficos (OLIVO, 2006).

A presença do Brasil no cenário mundial da exportação da carne de frango justifica-se pela expansão das plantas industriais avícolas, pela produção de cortes especiais, porções ou peças diferenciadas ao invés do frango inteiro, produtos com alto valor agregado, produtos congelados, carnes pré-cozidas, empanados e hambúrgueres de frango associados ao baixo custo de produção, ocasionado principalmente pela disponibilidade de matérias-primas indispensáveis à produção, como o milho e a soja, possibilitam a entrada do produto brasileiro em novos mercados consumidores (BELUSSO; HESPANHOL, 2010).

A estrutura óssea final da desossa manual pode servir de fonte protéica para a obtenção de hidrolisados protéicos, utilizados em formulações específicas tais como produtos geriátricos, suplementos energéticos, dietas para controle de peso ou terapêuticas ou ainda dietas entéricas (SLIZYTE et al., 2005). A grande maioria dos hidrolisados utilizados, presentemente, são obtidos da caseína e da proteína de soja.

As metodologias mais usuais para a obtenção dos hidrolisados protéicos são a hidrólise alcalina, a hidrólise enzimática e a hidrólise ácida ou a combinação de dois ou mais destes métodos (ADLER-NISSEN 1986; LAHL & BRAUN, 1994).

No método enzimático o princípio básico para a obtenção do hidrolisado protéico envolve a quebra hidrolítica das longas cadeias de moléculas protéicas pela adição de enzimas vegetais ou por proteases microbianas. A catálise enzimática possui benefícios, como o aumento da qualidade dos produtos, a redução dos custos de laboratório e de maquinário, visando com isto à melhoria ou a obtenção de produtos diferenciados na indústria alimentícia (MUSSATTO, FERNANDES, MILAGRES, 2007).

Os hidrolisados protéicos são aproveitados principalmente na gestão nutricional de indivíduos que não conseguem digerir totalmente a proteína pura. Principalmente os hidrolisados ricos em peptídeos de baixo peso molecular, especialmente di e tri

peptídeos, com o mínimo possível de aminoácidos livres, demonstram possuir mais utilizações alimentares devido aos seus valores nutricionais e terapêuticos aumentados (BHASKAR et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de hidrolisados liofilizados a partir de carcaças de frango desossadas manualmente (CMD) utilizando para isto diferentes enzimas proteolíticas avaliando-se o processo de obtenção dos hidrolisados, composição, grau de hidrólise e o rendimento obtido.

2 Materiais e Métodos

Os experimentos foram todos realizados nos laboratórios do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)/RS .

2.1 Material

A matéria-prima utilizada foi a estrutura óssea oriunda da desossa manual, aqui denominada de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango congelada, obtida de animais abatidos com aproximadamente 42 dias e com peso médio de 2,5 kg, adquirida de um abatedouro da região sul do Brasil. Antes da sua utilização a mesma foi descongelada sob temperatura de refrigeração e cortada em pedaços menores com faca de aço inox para facilitar sua homogeneização durante o tempo de hidrólise. Para a realização da composição proximal da carne aderida nesta estrutura utilizou-se uma faca de aço inox comum para retirá-la e posteriormente homogeneizá-la em liquidificador. As amostras apresentaram um pH médio durante o experimento de 6,34.

2.2 Enzimas

Foram utilizadas três enzimas, a papaína comercialmente pura denominada Papain, From Papaya Látex-1,5 units/MG solid (Sigma Aldrich®), que é uma cisteína protease da família C1-peptidase. Foi utilizada também a Flavourzyme que é uma aminopeptidase produzida por fermentação submersa de uma linhagem selecionada

do fungo *Aspergillus oryzae*, e utilizadas para hidrólise de proteínas sob condições neutras ou levemente ácidas. A Flavourzyme1000 L® é uma exopeptidase com uma atividade de 1 LAPU/g. Uma LAPU (Unidade Leucina Aminopeptidase) é a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de leucina-p-nitroanilida por minuto. A terceira enzima testada foi Protamex® que é uma enzima proteolítica produzida por fermentação submersa de *Bacillus licheniformes* e *Bacillus amyloliquefaciens* com atividade declarada de 1,5 AU-NH/g. As duas últimas enzimas mencionadas foram fornecidas pela Novozymes Latina Americana Ltda.

2.3 Composição proximal da matéria-prima e dos hidrolisados liofilizados

A composição proximal da carcaça manualmente desossada de frango (CMD) e dos diferentes hidrolisados obtidos foi determinada de acordo com a metodologia recomendada pela AOAC (1995). A quantidade de proteína presente foi determinada pelo método de determinação de nitrogênio total, Kjeldahl ($N \times 6,25$); lipídios pelo método gravimétrico de extração a quente utilizando extrator de Soxhlet para a CMD e o método do Bligh & Dyer (1959) para os hidrolisados liofilizados; cinzas pelo método gravimétrico em mufla (550-600 °C) e o teor de umidade pelo método gravimétrico em estufa (105 °C).

2.4 Processo de obtenção do hidrolisado protéico

2.4.1 Condições de Hidrólise

Para a realização do processo de hidrólise foram utilizadas 250 g de carcaça manualmente desossada (CMD) /g ou mL de enzima acrescidas de 500 mL de água destilada (1:2) previamente aquecida e colocadas em banho termostaticado (Banho Ultratermostaticado Marconi modelo MA 184). As reações enzimáticas foram conduzidas à temperatura e pH de máxima atividade catalítica de cada enzima de acordo com a literatura e estão descritas na Tabela 1 (OGAWA; MAIA, 1999; CÂNDIDO; SGARBIERI, 2003). O pH das enzimas Flavourzyme e Protamex foram ajustados com solução de fosfato de sódio 0,2 M. Durante a hidrólise, as amostras e as enzimas foram continuamente agitadas com agitador mecânico (Agitador Marconi modelo MA 039) durante todo o tempo de hidrólise (120 minutos).

Tabela 1 – Sistemas enzimáticos de hidrólise.

Enzimas	[E]:[S] ^a	pH ^b	T°C ^c	Tempo (min.) ^d
Papaína	1:250	6,5	60	120
Flavourzyme	1:250	7,0	50	120
Protamex	1:250	7,0	50	120

^aRelação Enzima/Substrato (p/p); ^bpH ótimo de ação das enzimas; ^cTemperatura ótima de ação das enzimas; ^dTempo total de hidrólise.

Fonte: Elaboração dos autores.

Durante a hidrólise da CMD, caldos de amostras foram coletados aos 60 e 120 minutos de hidrólise. Todos os hidrolisados coletados foram filtrados em uma tela plástica com abertura de malha de 10 mesh, filtrados novamente em uma gaze e depois centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos em uma centrífuga (Cetribio-Servilab) para remover todas as partículas sólidas (fundo) e a gordura (camada superior).

Após hidrólise os resíduos ósseos foram pesados para a realização do cálculo de percentual de hidrólise.

A proteína hidrolisada foi então aquecida a 95°C por 15 minutos para inativar a enzima e em seguida foi resfriada a temperatura ambiente, congelada e então liofilizada a uma temperatura de -54°C em liofilizador (LD 1500 Terroni).

2.4.2 Determinação do Grau de Hidrólise (GH)

Alíquotas de hidrolisado durante os tempos indicados foram retiradas e a reação foi inativada com adição de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Após repouso de 10 minutos e filtração para a remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA as proteínas solúveis foram quantificadas pelo método de Lowry et al. (1951), expresso em mg de albumina. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro (Modelo SP-220–Biospectro) a 650 nm. O grau de hidrólise foi medido segundo método descrito por Hoyle e Merrit (1994) e por Liceaga-Gesualdo e Li-Chan (1999), sendo expresso como percentagem de proteínas solúveis no TCA

em relação à quantidade de proteína inicial total, e calculado em mg/g, segundo a Equação 1.

$$GH = \frac{\text{Proteína Solúvel em TCA 10\% X 100}}{\text{Proteína Total da Amostra}} \quad (1)$$

2.4.3 Determinação do Teor de Sólidos, Cinzas e Proteínas Totais

Durante a hidrólise protéica foram retiradas alíquotas de amostras como mencionado no processo de obtenção de hidrólise e após a inativação enzimática foram encaminhadas para as análises de determinação do teor de sólidos solúveis totais em estufa a 105°C, de cinzas em mufla a 550°C e proteínas solúveis pelo método de Kjeldhal.

2.4.4 Determinação do percentual de Hidrólise e do rendimento da hidrólise

O percentual de hidrólise (o quanto de carne foi retirada da carcaça) foi avaliado por diferença de peso da carcaça manualmente desossada (CMD) antes e depois do tempo de hidrólise de 60 minutos e 120 minutos. Para o cálculo do rendimento do hidrolisado liofilizado fez-se uma proporção da quantidade total de amostra (CMD) em relação ao hidrolisado liofilizado obtido.

2.5 Determinação dos aminoácidos dos hidrolisados protéicos

As proteínas constituintes das amostras foram hidrolisadas com HCl 6 N durante 24 horas a 110 °C. Os aminoácidos liberados durante a hidrólise ácida reagem com Fenilisotilcianato (PITC), separados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa e detectados por ultravioleta (UV). A quantificação foi feita por calibração interna multinível segundo a metodologia descrita por LAMIC (2012).

2.6 Análise objetiva da cor dos hidrolisados protéicos

A avaliação objetiva da cor dos hidrolisados obtidos foi realizada através do sistema CIE, utilizando-se o aparelho Minolta Chroma Meter, CR-300 (MINOLTA), através

dos parâmetros L* (luminosidade), a* (direção para o vermelho) e b* (direção para o amarelo), segundo ANSORENA et al. (1997). Minolta Chroma Meter CR-300 usa iluminação difusa (lâmpada de xenônio) e um ângulo de observação de 0°C. A calibração do aparelho foi feita com o disco branco, sendo que tanto a leitura de L (brilho) como das cores, do vermelho (a) ao verde e do amarelo (b) ao azul, foram realizadas a temperatura ambiente.

2.7 Análise Estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente mediante a Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si através do teste de Tukey ao nível de 5% de significância pelo Sistema IBM® SPSS® Statistcs (Versão 20).

3 Resultados e Discussão

3.1 Composição proximal da matéria-prima utilizada na hidrólise e dos hidrolisados liofilizados

A Tabela 2 mostra as características da matéria prima utilizada no experimento (CMD). Na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos-TACO (2011), os valores encontrados foram diferentes dos valores citados para a amostra de frango inteiro com pele cru, cujos valores são de 66,5% de umidade, 16,4% de proteína, 17,3% de lipídeos e 0,7% de cinzas. Os dados apresentados neste trabalho estão próximos aos relatados por Trindade; Felício; Castillo (2004), para CMS de galinha, onde citam várias composições centesimais de carne mecanicamente separada de frangos e galinhas. O teor de lipídeos apresentado na Tabela 2 pode ser explicada pela utilização de pele e de todas as gorduras corporais que a carcaça apresentava. Ao comparar-se a carne retirada manualmente da carcaça resultante da desossa manual pode-se observar que a mesma possui uma composição diferenciada da carne mecanicamente separada. Gonçalves et al. (2009) analisaram 20 amostras de CMS de frango e encontraram valores médios de 16% de proteína, 17% de lipídeos, 61% de umidade e 1,17 de cinzas. A diferença pode estar relacionada ao tipo de corte utilizado e também ao processo empregado na obtenção da CMS, pois a fabricação de CMS pode ser realizada com várias partes da carcaça. Quando são

utilizadas partes do peito o produto obtido é de melhor qualidade. O processo também influencia, pois o sistema *hollow drum* (tambor oco), é melhor que o sistema *auger* (rosca sem fim), já que com este processo o produto caracteriza-se pelo alto conteúdo de cálcio e de fragmentos de ossos e cartilagens (HENCKEL et al., 2004).

Tabela 2 – Média da composição proximal e valor calórico da carcaça manualmente desossada (CMD) utilizadas no experimento.

Determinações(b.u)	Carcaça Manualmente Desossada (CMD)
Umidade (%)	58,87 ± 0,19
Cinzas (%)	0,63 ± 0,05
Lipídeos (%)	26,79 ± 4,00
Proteínas (%)	13,25 ± 0,48
Carboidratos (%)	0,46 ± 0,05
Valor calórico (Kcal/100g)	295,95 ± 2,62

Fonte: Elaboração dos autores

A composição química dos alimentos tem um importante papel no fornecimento de nutrientes essenciais para a manutenção da saúde humana. A Tabela 3 apresenta os dados da composição proximal dos hidrolisados obtidos da CMD com as diferentes enzimas proteolíticas. O teor de umidade foi significativamente diferente ($p < 0,05$) entre os hidrolisados obtidos os quais variaram de 4,58 a 8,51%. A maioria dos estudos realizados com proteína hidrolisada de peixes apresenta teores de umidade inferiores a 10% (OVISSIPOUR et al., 2009; CHALAMAIAH et al, 2010; FOH et al, 2011). Os baixos percentuais de umidade apresentados pelos hidrolisados protéicos são determinados pelas metodologias de secagem, assim como pelo o tipo de amostra empregada (BUENO-SOLANO et al., 2009).

O teor de cinzas foi significativamente diferente ($p < 0,05$) entre os hidrolisados obtidos e variaram de 4,81 a 12,86% (Tabela 3). Os teores maiores de cinzas apresentados pelo hidrolisados obtidos com a Flavourzyme e Protamex, justificam-se pelo emprego da solução de fosfato de sódio 0,2 M para o ajuste de pH.

O conteúdo de lipídeos não variou entre os hidrolisados obtidos com a Papaína e Flavourzyme, mas estes foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) do hidrolisado

obtido com a enzima Protamex, porém todos se apresentaram menores que o teor de lipídeos da matéria-prima inicial (CMD). Rossi et al. (2009), ao hidrolisarem carne mecanicamente separada de frango com a enzima Alcalase 2,4 L FG obtiveram um hidrolisado com 1,08% de lipídeos indicando que o processo de retirada da gordura na centrifugação foi extremamente eficiente.

Os teores de proteínas (Tabela 3) apresentados pelos hidrolisados protéicos obtidos pela hidrólise com a enzima Flavourzyme e Protamex foram semelhantes, porém diferiram ($p < 0,05$) significativamente do resultado obtido com a Papaína. A composição química do hidrolisado obtido com a papaína assemelhou-se aos resultados obtidos por Fonkwe e Singh (1996), que obtiveram aproximadamente 78% de proteínas em uma hidrólise do resíduo da carne mecanicamente separada de peru. Já os resultados apresentados por Rossi et al. (2009), assemelham-se aos obtidos neste estudo para as enzimas Flavourzyme e Protamex.

Tabela 3 – Composição proximal dos hidrolisados liofilizados de carcaça manualmente desossada (CMD) obtidos através da hidrólise com diferentes enzimas.

Enzima	Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídeos (%)	Proteína (%)	Valor CAL (Kcal/100g)
Papaína	4,58 ^c ±0,15	4,81 ^c ±0,03	6,81 ^a ±0,63	79,36 ^a ±0,32	396,47 ^a ±2,69
Flavourzyme	8,51 ^a ±0,24	12,86 ^a ±0,06	5,45 ^a ±0,47	67,86 ^b ±0,66	341,79 ^b ±2,44
Protamex	6,23 ^b ±0,31	11,07 ^b ±0,09	3,27 ^b ±0,97	68,21 ^b ±0,62	347,12 ^b ±3,42

Médias dentro da mesma coluna, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaboração dos autores.

Os teores de proteínas apresentados pelos hidrolisados obtidos com as diferentes enzimas proteolíticas são maiores que os apresentados pela matéria-prima inicial utilizada neste experimento. O procedimento normal de utilização destas carcaças gera a carne mecanicamente separada de frango (CMS), cujos teores protéicos são de aproximadamente 13%. Com este processo de hidrólise enzimática tem-se a produção de um hidrolisado em pó com grandes possibilidades de uso tanto pela indústria de alimentos como pela indústria farmacêutica para a produção de produtos geriátricos, dietas para controle de peso, terapêuticas ou dietas entéricas, além de suplementos energéticos para atletas.

Chalamaiah et al. (2012), realizaram uma extensa revisão bibliográfica onde estão reunidos dados da composição proximal dos hidrolisados protéicos de diversas espécies de peixes, obtidos com as mais diferentes enzimas proteolíticas, porém não são comuns dados na literatura sobre hidrolisados protéicos obtidos a partir do residual ósseo gerado da desossa manual de carne de frango.

3.2 Determinação do Grau de Hidrólise (GH)

O grau de hidrólise fornece uma idéia do mensuramento da extensão da proteína clivada, o que vai influenciar nas propriedades funcionais destes hidrolisados (LICEAGA e LI-CHAN, 1999). Os resultados obtidos para o grau de hidrólise utilizando-se como enzimas proteolíticas Papaína, Flavourzyme e Protamex e como substrato a carcaça manualmente desossada (CMD) de frango estão apresentados na Tabela 4. No final da hidrólise (120 minutos) observam-se valores de 43%, 20% e 51% de GH para a Papaína, Flavourzyme e Protamex, respectivamente. Com o mesmo substrato e a mesma quantidade de enzima, o GH apresentado pela Protamex foi significativamente maior ($p < 0,05$) que a Papaína e a Flavourzyme.

Herpandi et al. (2012), utilizaram diferentes enzimas proteolíticas (Alcalase® 2.4L FG, Protamex®, Neutrase® 1,5 mg e Flavourzyme® 500 mg) para hidrolisar atum (*Katsuwonus pelamis*) e constataram que a Alcalase® 2.4L FG apresentou o maior grau de hidrólise entre todas as proteases seguido da Protamex®, Flavourzyme 500MG® e Neutrase® 1,5 mg.

Tabela 4 – Grau de hidrólise apresentado durante 60 3 120 minutos de hidrólise para as diferentes enzimas utilizadas em condições estabelecidas de pH e temperatura.

Enzimas	Tempo de Hidrólise (minutos) /Grau de Hidrólise	
	60 min.	120 min.
Papaína	39,25 ^b ±4,97	43,19 ^b ±4,69
Flavourzyme	16,72 ^c ±1,89	20,25 ^c ±4,33
Protamex	47,12 ^a ±5,27	51,31 ^a ±4,61

Médias dentro da mesma coluna, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Fonte: elaboração dos autores

Charoenphun et al. (2013), obtiveram após 6 horas de hidrólise de tilápia (*Oreochromis niloticus*) com diferentes enzimas, entre elas a Papaína e a Flavourzyme, graus de hidrólise de 41,6% e 35,6%, respectivamente. Mesmo utilizando matérias-primas diferentes o resultado para a Papaína assemelha-se muito com o encontrado neste estudo, no tempo de 60 minutos indicando que talvez não fosse necessário um tempo tão longo de hidrólise para esta protease. Entretanto, os resultados apresentados para a Flavourzyme foram extremamente maiores indicando que esta exopeptidase necessita de um tempo maior para obterem-se melhores resultados de hidrólise para esta enzima.

No entanto, Santos (2006), que analisou o grau de hidrólise obtido com a enzima Flavourzyme, na elaboração de hidrolisado de Cabrinha (*Prionotus punctatus*) com uma concentração substrato/tampão de 1g/mL; 2% de enzima/substrato; pH 7 e 60 minutos de reação a 50 °C encontrou um grau de hidrólise de 24,7%, utilizando uma concentração de enzima/ substrato bem maior que a utilizada no presente estudo.

Como pode ser observado na Tabela 4, o tempo pode influenciar positivamente no grau de hidrólise, isto está de acordo com o trabalho realizado por Schmidt e Salas-Mellado (2009), que obtiveram um efeito positivo para esta variável em um trabalho sobre a influência da ação das enzimas Alcalase e Flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. Também Liceaga-Gesualdo e Li-Chan (1999), observaram uma hidrólise rápida de carne de arenque (*Clupea harengus*), atingindo um GH de 24% em 20 minutos de incubação com a enzima alcalase, a pH 8,0 e 50 °C, sendo que após 60 minutos de hidrólise este valor aumentou para 36% de grau de hidrólise.

Os altos teores de proteínas apresentados neste trabalho demonstram que estes hidrolisados possuem um grande potencial para serem utilizados como suplementos protéicos na nutrição humana.

3.3 Determinação do teor de Proteínas Solúveis, Sólidos Totais e Cinzas durante o tempo de hidrólise

A Tabela 5 apresenta os valores de proteínas durante o tempo total de hidrólise para as três enzimas utilizadas no experimento. A enzima Papaína aos 120 minutos de hidrólise apresentou o maior percentual de proteínas diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) da Protamex.

Os teores de proteínas obtidos com as enzimas proteolíticas neste estudo são semelhantes aos relatos de muitas pesquisas com hidrolisados obtidos de diferentes espécies de peixes que variaram de 60% a 90% da composição total (DONG et al., 2005; CHOI et al., 2009; KHANTAPHANT et al., 2011).

Tabela 5 – Teor de proteínas dos hidrolisados obtidos de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango durante o tempo de hidrólise de 120 minutos com diferentes enzimas.

Enzimas	Proteínas (%)	
	Tempo de Hidrólise (minutos)	
	60 min.	120 min.
Papaína	74,37 ^a ±10,45	75,08 ^a ±6,70
Flavourzyme	61,58 ^b ±9,79	66,80 ^{ab} ±8,87
Protamex	63,99 ^{ab} ±6,36	63,96 ^b ±5,29

Médias dentro da mesma coluna, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey. Resultados em (g/100g base seca).

Fonte: Elaboração dos autores.

Na Tabela 6 podem ser observados os teores de sólidos solúveis e de atividade de água obtidos durante o tempo de hidrólise para as três enzimas proteolíticas utilizadas.

O teor de sólidos solúveis totais (Tabela 6) não variou significativamente ($p < 0,05$) nos tempos de 60 e 120 minutos de hidrólise entre as enzimas Papaína e Protamex,

porém a enzima Flavourzyme apresentou um percentual de sólidos solúveis estatisticamente menor ($p < 0,05$) que as outras duas enzimas.

Os teores de sólidos solúveis apresentados pela enzima Papaína e Protamex são semelhantes aos relatados por Stabile (1991), que ao determinar as condições ideais da hidrólise da proteína de carne com suco de abacaxi (carne/suco 1:1) obteve valores de sólidos de 7,6 g/100g.

Observa-se durante a hidrólise um aumento da solubilidade das proteínas e isto é evidenciado pelo aumento da concentração dos sólidos solúveis ao longo do tempo até atingir-se um patamar onde a concentração se estabiliza (FONKWE. & SINGH, 1996).

Tabela 6 – Percentual de sólidos solúveis dos hidrolisados obtidos de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango durante o tempo de hidrólise de 60 e 120 minutos com diferentes enzimas e a atividade de água dos hidrolisados liofilizados.

Enzimas	Tempo de Hidrólise (minutos)/Percentual de Sólidos Solúveis		Atividade de água do Hidrolisado Liofilizado (Aa)
	60 min.	120 min.	120 min.
Papaína	7,11 ^a ±0,74	8,55 ^a ±0,32	0,1408 ^c ±0,0123
Flavourzyme	5,49 ^b ±1,10	6,34 ^b ±0,71	0,2884 ^b ±0,0178
Protamex	7,32 ^a ±1,03	8,07 ^a ±1,55	0,3273 ^a ±0,0147

Médias dentro da mesma coluna, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey. Resultados em (g/100g base úmida).

Fonte: elaboração dos autores

A medida da atividade de água é de fundamental importância, para o controle de qualidade dos alimentos visto que, por meio dela, podem ser previstas reações químicas, enzimáticas, e desenvolvimento de microrganismos. A partir do conhecimento da atividade de água pode-se, também, propor sistemas adequados de embalagens para diferentes produtos alimentícios (FELLOWS, 2006). Os hidrolisados protéicos são altamente perecíveis principalmente devido ao alto conteúdo de proteínas e, portanto, necessitam de metodologias para a sua preservação como secagem por pulverização ou liofilização.

Os valores encontrados para a atividade de água para os hidrolisados obtidos da CMD com diferentes enzimas proteolíticas (Tabela 6) diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre si. A Papaína produziu o hidrolisado com a menor atividade de água (0,14). Valor de atividade de água maior que estes resultados foi encontrado por Kurozawa et al., (2009), que relataram um valor de atividade de água de 0,43 ao estudarem o efeito dos agentes de suporte durante a secagem por pulverização sobre as propriedades físico-químicas de um hidrolisado protéico de carne de frango obtido pela ação da Alcalase® 2.4L.

A Tabela 7 apresenta os resultados de cinzas dos diferentes hidrolisados durante o tempo de hidrólise (60 e 120 minutos). Os resultados apresentados nos primeiros 60 minutos não variaram significativamente ($p < 0,05$), porém com 120 minutos o hidrolisado obtido com a Papaína apresentou teores significativamente menores de cinzas ($p < 0,05$), quando comparados aos outros hidrolisados. A maior concentração de cinzas verificada nos hidrolisados obtidos com a Flavourzyme e com a Protamex (6,75% a 7,97%) é decorrente do ajustamento do pH durante a hidrólise enzimática.

Da mesma forma outros autores obtiveram níveis elevados de cinzas nos experimentos de hidrólise e atribuíram ao ajustamento do pH para uma melhor ação das enzimas (DINIZ e MARTIN, 1997; LICEAGA e LI-CHAN, 1999; NEVES, MIRA e MARQUEZ, 2004; MARTINS, COSTA e PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2009).

Tabela 7 – Percentual de cinzas dos hidrolisados obtidos de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango durante o tempo de hidrólise de 120 minutos com diferentes enzimas.

Enzimas	Tempo de Hidrólise (minutos)/Percentual de Cinzas	
	60 min.	120 min.
Papaína	4,80 ^b ±0,36	4,68 ^b ±0,48
Flavourzyme	7,97 ^a ±1,44	6,76 ^a ±0,99
Protamex	7,24 ^a ±1,69	7,08 ^a ±1,28

Médias dentro da mesma coluna, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey. Resultados em (g/100g base úmida).

Fonte: Elaboração dos autores

3.3 Determinação do Percentual de Hidrólise e do Rendimento da hidrólise

Os percentuais de hidrólise após 120 minutos de processo hidrolítico e os rendimentos dos hidrolisados submetidos ao processo de liofilização estão demonstrados na Tabela 8. Após 60 minutos de hidrólise todos os hidrolisados apresentaram percentuais de hidrólise significativamente diferentes ($p < 0,05$), e a Papaína apresentou um maior percentual, que não variou da primeira para a segunda hora. Porém, aos 120 minutos, os hidrolisados obtidos com a Papaína e a Protamex não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$), enquanto o hidrolisado obtido com a Flavourzyme apresentou o menor percentual (58,20%). Provavelmente uma justificativa para isto seja o fato que a papaína, uma sulfidril protease, ou seja, uma enzima que possui um grupo de enxofre no seu sítio ativo apresenta baixa especificidade, hidrolisando ligações amida e éster, tanto em peptídeos como em proteínas (LIENER, 1974; REED, 1975).

Tabela 8 – Percentual de hidrólise e rendimento total (liofilizados) dos hidrolisados obtidos de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango durante o tempo de hidrólise de 60 e 120 minutos com diferentes enzimas.

Enzimas	Hidrólise (%)		Rendimento (%)
	60 min.	120 min.	120 min.
Papaína	80,61 ^a ±5,49	86,13 ^a ±2,24	10,55 ^a ±0,04
Flavourzyme	34,83 ^c ±5,79	58,20 ^b ±5,65	4,84 ^b ±0,46
Protamex	67,69 ^b ±4,12	78,03 ^a ±3,61	10,32 ^a ±0,09

Médias dentro da mesma coluna, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%.

Fonte: Elaboração dos autores

O rendimento do hidrolisado liofilizado (Tabela 8) obtido através da hidrólise com a Flavourzyme, diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos hidrolisados obtidos com a Papaína e a Protamex, repetindo o mesmo comportamento referente ao percentual de hidrólise aos 120 minutos. Santos (2011), em um trabalho sobre a produção de hidrolisados de proteína de pescado (HPP) a partir de subprodutos da indústria pesqueira encontrou aproximadamente 10% de rendimento utilizando como enzima proteolítica a Neutrase®.

3.4 Determinação dos aminoácidos dos hidrolisados protéicos

A Tabela 9 apresenta a composição dos aminoácidos dos hidrolisados obtidos com as diferentes enzimas proteolíticas. O valor nutritivo das proteínas dietéticas é

determinado pelo padrão e quantidade de aminoácidos essenciais (XIA, WANG; XU, 2007).

Tabela 9 – Composição de aminoácidos dos hidrolisados obtidos com diferentes enzimas a partir de carcaça manualmente desossada de frango (CMD) em comparação as recomendações da FAO(1985).

Aminoácidos (mg/g)	Enzimas			FAO (2-5 anos)	FAO (adultos)
	Papaína	Flavourzyme	Protamex		
Não essenciais					
Ácido aspártico	73,7	49,6	62,5	-	-
Ácido glutâmico	117,6	92,7	107,7	-	-
Serina	30,1	20,6	25,7	-	-
Glicina	52,3	44,1	46,4	-	-
Arginina	54,8	9,90	46,4	-	-
Treonina	28,1	30,1	26,6	34	5
Alanina	46,2	35,5	43,6	-	-
Prolina	43,9	33,4	37,4	-	-
Essenciais					
Histidina	22,4	19,5	20,6	19	16
Tirosina	24,4	13,6	18,2	-	-
Valina	36,8	23,3	28,9	35	13
Metionina	37,2	16,2	30,6	24*	17*
Cistina	1,00	1,00	1,00	-	-
Isoleucina	34,1	19,3	25,7	28	13
Leucina	63,3	39,5	51,6	66	19
Fenilalanina	39,3	26,2	34,1	63**	19**
Lisina	76,0	57,8	71,8	58	16
Triptofano	-	-	-	11	9

*Dados que somam metionina+cistina;**dados que somam fenilalanina+tirosina- FAO: Food and Agriculture Organization.

Fonte: Elaboração dos autores.

A presença de um ou mais aminoácidos essenciais em quantidades suficientes aumenta o valor nutritivo da proteína (RANGEL et al., (2004). O perfil das proteínas dos diferentes hidrolisados foi verificado e comparado com o da FAO (1985), que estima as necessidades de aminoácidos para crianças e adultos. O perfil de aminoácidos (Tabela 9) dos hidrolisados de carne manualmente desossada de frango (CMD) obtida através hidrólise enzimática com a Papaína continha quantidades mais elevadas de todos os aminoácidos essenciais, exceto para triptofano (eliminado pela metodologia), quando comparado com a referência da OMS para adultos. Portanto, o hidrolisado que mais se aproxima das quantidades de

aminoácidos recomendados pela FAO (1985) é o obtido pela hidrólise com a Papaína.

Soares et al., (2004) utilizaram três enzimas isoladamente (uma protease do *Aspergillus oryzae*, a papaína e a pepsina) para a hidrólise de leite em pó desnatado e avaliando a ação enzimática sobre o perfil peptídico dos hidrolisados observaram que o melhor perfil peptídico nutricional foi obtido com a Papaína.

A análise de aminoácidos realizada por Sun et al., (2010) em um estudo sobre a utilização de um hidrolisado obtido enzimaticamente por meio do resíduo de carne mecanicamente separada de frango, em uma salsicha tipo cantonês revelou que a glicina foi o aminoácido encontrado em maior quantidade neste tipo de hidrolisado (21,46%), além do ácido glutâmico, prolina, ácido aspártico, treonina e a lisina.

3.5. Análise objetiva da cor dos hidrolisados protéicos

Os valores da determinação da cor dos hidrolisados liofilizados obtidos com diferentes enzimas proteolíticas encontram-se na Tabela 10. Os valores de L* (brilho) e de a* (índice vermelho) diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) para as três enzimas utilizadas. O parâmetro de cor vermelha (a*) foi maior com o hidrolisado obtido com a enzima Protamex. Segundo Bueno-Solano et al. (2009), a hidrólise de proteínas produz peptídeos com cor acastanhada que podem gerar uma alteração de cor nos produtos alimentícios nos quais estes hidrolisados são adicionados.

O parâmetro de cor amarela não variou entre os hidrolisados (Tabela 10) obtidos com a Flavourzyme e a Protamex, porém estes diferiram significativamente ($p < 0,05$) do hidrolisado obtido com a Papaína que apresentou uma maior intensidade para o amarelo.

Sun et al. (2010), concluíram que o hidrolisado do resíduo de carne mecanicamente separada de frango obtido por hidrólise enzimática com Pancreatina, pode ser um excelente precursor para a reação de Maillard devido a distribuição do peso molecular, do perfil de aminoácidos e da quantidade de aminoácidos livres.

Tabela 10- Valores médios da determinação de cor dos hidrolisados proteicos de carcaça manualmente desossada (CMD) obtidos através da hidrólise com diferentes enzimas, expressos como L* (luminosidade), a* (índice vermelho) e b* (índice amarelo).

Enzimas	L*	a*	b*
Papaína	76,50 ^b ±0,34	-1,45 ^c ±0,75	26,44 ^a ±2,96
Flavourzyme	79,24 ^a ±0,23	2,98 ^b ±0,07	17,45 ^b ±0,11
Protamex	71,09 ^c ±0,44	5,04 ^a ±0,10	18,72 ^b ±0,14

Médias dentro da mesma coluna, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%.

Fonte: Elaboração dos autores.

4 Conclusão

Os hidrolisados protéicos obtidos da carcaça manualmente desossada (CMD) de frango apresentaram alto conteúdo protéico caracterizando-se como uma matéria prima promissora na formulação de dietas especiais. A enzima Protamex apresentou o melhor grau de hidrólise seguida da Papaína e da Flavourzyme. Quanto ao percentual de hidrólise e rendimento total, os hidrolisados obtidos com a Papaína e a Protamex obtiveram os maiores valores que com a Flavourzyme. A composição de aminoácido demonstra que o hidrolisado obtido da Papaína possui uma composição mais próxima da recomendada pelos órgãos de controle.

Referências

A.O.A.C. - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**, 16th ed., Horowitz: Washington D.C., 1995.

ADLER-NISSEN, J. **Enzimic hydrolysis of food proteins**. Elsevier Applied Science. Barking: Elsevier Applied Science, p.427, 1986.

ANSORENA, D. et al. Colour evaluation of chorizo de Pamplona, a Spanish dry fermented sausage: Comparison between the CIE L*a*b* and the Hunter Lab systems with illuminants D 65 and C'. **Meat Science**, v.46, n.4, p.313-318,1997.

BELUSSO, D.; HESPANHOL, A. N. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. **Revista Percursos – NEMO**. Maringá, v. 2, n. 1, p. 25- 51, 2010.

BHASKAR, N., MODI, V.K., GOVINDARAJU, K., RADHA, C., LALITHA, R.G. Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. **Bioresource Technology** 98 (2), 388–394, 2007.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification Can. **J. Biochem. Physiol.** 37(8): 911-7, 1959.

BUENO-SOLANO, C.; LOPEZ-CERVANTES, J.; CAMPAS-BAYPOLI, O. N.; LAUTERIO GARCIA, R.; ADAN-BANTE, N. P.; & SANCHEZ-MACHADO, D. I. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. **Food Chemistry**, 112, 671–675, 2009.

CÂNDIDO, L.M.B.; SGARBIERI, V.C. A hidrólise enzimática de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) proteínas miofibrilares: efeitos sobre propriedades nutricionais e hidrofílico. **J. Sci. Food Agric.**, 83: 937-944, 2003.

CHALAMAIAH, M.; NARSINGRAO, G.; RAO, D. G.; & JYOTHIRMAYI, T. Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. **Food Chemistry**, 120, 652–657, 2010.

CHAROENPHUN, N.; CHEIRSILP B.; SIRINUPONG, N.; YOURAVONG, W. Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate Eur. **Food Res Technol**, 236:57–63, 2013.

CHOI, Y. J.; HUR, S.; CHOI, B. D.; KONNO, K.; & PARK, J. W. Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrolysates. **Journal of Food Science**, 74, C17–C24, 2009.

DINIZ, F.M.; MARTIN, A.M. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein. Composition of the hydrolysates. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v.48, p.191-200, 1997.

DONG, Y.; SHENG, G.; FU, J.; & WEN, K. Chemical characterization and antianaemia activity of fish protein hydrolysate from *Saurida elongate*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 85, 2033–2039, 2005.

FELLOWS, P.J. **Tecnologia do Processamento dos Alimentos: Princípios e Práticas**. Tradução Florencia Cladera Oliveira. et al. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.602p.

FONKWE, L.G.; SINGH, R.K. Protein recovery from mechanically Deboned Turkey residue by Enzymic Hydrolysis. **Process Biochemistry**, Watford, n.6, p.605-616, 1996.

FOOD and AGRICULTURE ORGANIZATION. Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/ UNU Expert Consultation. World Health Organization. Geneva: World Health Organization; 1985.

FOH, M. B. K., KAMARA, M. T., AMADOU, I., FOH, B. M., & WENSHUI, X. Chemical and physicochemical properties of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish protein

hydrolysates and concentrate. **International Journal of Biological Chemistry**, 5, 21–36, 2011.

GONÇALVES, R. M. et al., Avaliação físico-química e conteúdo de metais pesados em carne mecanicamente separada (CMS) de frango e de bovino produzidas no estado de Goiás, **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 553-559, abr./jun. 2009.

HENCKEL, P.; VYBERG, M.; THODE, S.; HERMANSEN, S. Assessing the quality of mechanically and manually recovered chicken meat. **Lebensm.-Wiss.U.-Technol**, v. 37, p. 593-601, 2004.

HERPANDI, HUDA, N., ROSMA, A. & WAN NADIAH W. A. Degree of hydrolysis and free tryptophan content of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) protein hydrolysates produced with different type of industrial proteases International. **Food Research Journal**, 19(3): 863-867, 2012.

HOYLE, N.T.; MERRIT, J.H. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, Chicago, v.59, n.1, p.76-79, 1994.

KHANTAPHANT, S.; BENJAKUL, S.; & KISHIMURA, H. Antioxidative and ACE inhibitor activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper prepared using pyloric caeca and commercial proteases. **Process Biochemistry**, 46, 318–327, 2011.

KUROZAWA, L. E. PARK, K. J. HUBINGER, M. D. Effect of carrier agents on the physicochemical properties of a spray dried chicken meat protein hydrolysate, **Journal of Food Engineering**. 94, 326–333, 2009.

LAHL, W.J. & BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, 48 (10): 68-71, 1994.

LAMIC - Laboratório de Análises Micotoxicológicas - Universidade Federal de Santa Maria (2012).

LICEAGA-GESUALDO, A.M.; LI-CHAN, E.C.Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*clupea harengus*). **J. Food Sci.**, v.64, n.6, p.1000-1004, 1999.

LIENER, I. E. The sulfhydryl proteases. In: WHITAKER, J.R. **Food related enzymes**. Washington: American Chemistry Society, 374p. (Advances in Chemistry Series, 136), 1974.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R.J.; Protein measurement with the Folin Phenol reagent, **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p 265-275, 1951.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Relatório de avaliação dos objetivos setoriais e dos programas do plano plurianual 2008-2011, Ano Base 2010 Brasília DF, 2011.

MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*) **Química Nova**, Vol. 32, No. 1, 61-66, 2009.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Biotecnologia - Enzimas Ferramentas na Indústria. **Ciência Hoje**, vol.41, nº 242, out, 2007.
NEVES, R.A.M.; MIRA, N.V.M. ; MARQUEZ, U.M. L.. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, vol.24, n.1, pp. 101-108. , 2004.

OGAWA, N.B.P.; MAIA, E.L. **Manual de Pesca: ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Varela, 1999. 430p.

OLIVO, R. **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango**. Criciúma, SC: Ed. Do Autor, 2006.

OVISSIPOUR, M.; ABEDIAN KENARI, A.; MOTAMEDZADEGAN, A.; RASCO, B.; SAFARI, R. & SHAHIRI, H. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. **Food Chemistry**, 115, 238–242, 2009.

RANGEL A.; SARAIVA K.; SCHWENGBER P.; NARCISO MS.; DOMONT GB., FERREIRA ST., et al. Biological evaluation of a protein isolate from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Food Chem.**; 87(4): 491-9. 2004.

REED, G. **Enzymes in food processing**. 2. ed. New York:Academic Press, 1975. 573p.

ROSSI, D.M.; FLÔRES, S.H.; VENZKE, J.G.; AYUB, M.A.Z. Biological evaluation of mechanically deboned chicken meat protein hydrolysate, **Revista de Nutrição**, Campinas, 22(6):879-885, nov./dez., 2009.

SANTOS, M. F. G. **Produção de hidrolisados de proteína de pescado (HPP) a partir de subprodutos da indústria do pescado de Peniche – Aplicações**, Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche Instituto Politécnico de Leiria, 2011.

SANTOS, S. D.; **Obtenção e avaliação de hidrolisado enzimático obtido a partir de pescado de baixo valor comercial**. Dissertação de Mestrado, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 2006.

SCHMIDT, C. G.; SALAS-MELLADO M.; Influência da ação das enzimas Alcalase e Flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango, **Química Nova**, Vol. 32, No. 5, 1144-1150, 2009.

SLIZYTE, R., DAUKSAS, E., FALCH, E., STORRO, I., RUSTAD, T., 2005. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochemistry** 40 (1), 2021–2033.

SOARES, R. D. L., SILVA, V. D. M., LOPES, D. C. F., JUNQUEIRA, R. G. A., et al., Perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 40, n. 3, jul./set., 2004.

STABILE, M.N.O. **Otimização do processo biotecnológico de hidrólise de carne bovina**. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1991.

SUN, W.; ZHAO, M.; CUI, C.; ZHAO, Q.; YANG, B. Effect of Maillard reaction products derived from the hydrolysate of mechanically deboned chicken residue on the antioxidant, textural and sensory properties of Cantonese sausages. **Meat Science**. 86, 276–282, 2010.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (TACO), NEPA-UNICAMP- 4. ed. rev. e ampl. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011.161p.

TRINDADE, M. A; FELÍCIO, P. E.; CASTILHO, C. J. C. Mechanically separated meat of broilers breeder and white layer spent hens. **Scientia Agricola**. v. 61. n. 2.p. 234-239, 2004.

XIA SH, WANG Z, XU SY. Characteristics of *Bellamya purificata* snail foot protein and enzymatic hydrolysates. *Food Chem.*, 101(3); 101:1188-96, 2007.

4.3 Artigo 3

Em fase final de revisão pelos autores para ser submetido a uma revista

Propriedades funcionais dos hidrolisados obtidos a partir de carne mecanicamente separada (CMS) e de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango através da utilização de diferentes enzimas proteolíticas

Propriedades funcionais dos hidrolisados obtidos de carne mecanicamente separada (CMS) e de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango com diferentes enzimas proteolíticas

Functional properties of hydrolysates obtained from mechanically separated meat (MSM) and manually deboned chicken carcass (MDC) with different proteolytic enzymes.

Resumo

A hidrólise de proteínas pode ser realizada com vários objetivos, entre eles alterar as propriedades funcionais ou produzir pequenos peptídeos e aminoácidos para serem utilizados em alimentos diferenciados, como por exemplo, em dietas enterais, ou em alimentos dietéticos ou ainda, como agentes flavorizantes. O objetivo deste trabalho foi verificar a influencia de diferentes enzimas proteolíticas nas propriedades funcionais de hidrolisados proteicos obtidos da carne mecanicamente separada (CMS) e de carcaças manualmente desossadas (CMD) de frango. As matérias-primas utilizadas foram adquiridas de um abatedouro da região e foram descongeladas sob-refrigeração. A CMS foi homogeneizada em processador e a carcaça foi cortada em pedaços menores com faca de aço inox para facilitar sua homogeneização durante o tempo de hidrólise. Foram utilizadas três enzimas comerciais Papaína[®], Flavourzyme[®] e Protamex[®]. A hidrólise ocorreu em banho termostaticado com temperatura, tempo e pH controlados. Foram analisadas a composição proximal dos hidrolisados liofilizados e o grau de hidrólise. As propriedades funcionais como solubilidade proteica, capacidade de retenção de água, capacidade de retenção de óleo, capacidade de emulsificação e estabilidade emulsificante dos hidrolisados proteicos foram também avaliadas. As propriedades funcionais dos hidrolisados obtidos da CMS e CMD mostraram-se diferenciadas para cada enzima e matéria-prima, e foram afetadas principalmente pelo grau de hidrólise individualizado apresentado pelas diferentes enzimas. A solubilidade proteica aumentou com o aumento do grau de hidrólise e o hidrolisado que apresentou maior solubilidade foi obtido com a CMS e a papaína como enzima proteolítica. A maior capacidade de retenção de água foi apresentada pelo hidrolisado obtido com a enzima Flavourzyme na CMS e esta propriedade é inversamente proporcional ao grau de hidrólise, igualmente a capacidade de retenção de óleo e a capacidade emulsificante, que foi maior para a Flavourzyme, nas duas matérias-primas utilizadas. Concluiu-se que os hidrolisados proteicos obtidos das diferentes matérias-primas possuem propriedades funcionais diferenciadas e determinantes na escolha da sua utilização como ingrediente na indústria alimentícia.

Palavras-chave: Hidrólise enzimática. Hidrolisados proteicos. Propriedades funcionais.

Abstract

The protein hydrolysis may be performed for various purposes, including altering the functional properties or producing small peptides and amino acids for use in different foods, such as enteral feeding, dietary foods or as flavoring agents. The aim of this study was to investigate the influence of different proteolytic enzymes in the functional properties of protein hydrolysates obtained from mechanically separated meat (MSM) and manually deboned chicken carcasses (MDC). The raw materials used were obtained from an abattoir region and thawed under refrigeration, the MSM was homogenized in a processor and the carcass was cut into smaller pieces with a stainless steel knife for easy mixing during the hydrolysis time. Three commercial enzymes were used: Papaína®, Flavourzyme® and Protamex®. Hydrolysis occurred in thermostatic bath, with controlled temperature, time and pH. Proximal composition of lyophilized hydrolysates and degree of hydrolysis analysis were performed. Functional properties such as protein solubility, water holding capacity, retention capacity oil, emulsifying capacity and emulsifying stability of the protein hydrolysates were also analyzed. The functional properties of the hydrolysates obtained from MSM and MDC proved to be different for each enzyme and raw material, and are affected mainly by the individualized degree of hydrolysis presented by different enzymes. The protein solubility increased with increasing degree of hydrolysis and the hydrolyzates with highest solubility were obtained with MSM and Papaína as the proteolytic enzyme. The highest water retention capacity was presented by the hydrolyzate with the enzyme Flavourzyme on MSM and this property is inversely proportional to the degree of hydrolysis. So was the ability to retain oil and emulsifying capacity, which was higher with Flavourzyme for both raw materials used. We concluded that protein hydrolysates obtained from different raw materials have different functional properties that determine the choice of their use as an ingredient in food industry.

Keywords: Enzymatic hydrolysis. Protein hydrolysates. Functional properties.

Introdução

A utilização dos hidrolisados proteicos e aminoácidos livres tem despertado grande interesse da indústria alimentícia, pois são matérias primas promissoras na elaboração de alimentos diferenciados como fórmulas sintéticas prescritas para indivíduos com limitação para digerir proteína intacta (CHIANG; SHIH; CHU, 1999), e também para grupos específicos como, por exemplo, para lactantes com distúrbios metabólicos e alergias alimentares, idosos e atletas que necessitam repor nutrientes (ZARRABIAN et al., 1999; CLEMENTE, 2000; NEVES; MIRA; MARQUEZ, 2004).

A hidrólise de proteínas é um importante bioprocesso para melhorar as propriedades físicas, químicas, funcionais e nutricionais em relação à proteína original. A hidrólise enzimática apresenta algumas vantagens em relação à hidrólise química (ácida ou alcalina), como por exemplo, a maior especificidade de ação, o maior controle da hidrólise, as

condições moderadas de ação, o menor conteúdo de sal no hidrolisado obtido, além da menor quantidade de enzimas e da facilidade para inativá-las (ZAVAREZE et al., 2009).

As modificações estruturais produzidas pelas proteases de origem animal, vegetal e microbiana nas proteínas são capazes de alterar e melhorar as propriedades funcionais, devido a sua especificidade e capacidade de modificar uma grande variedade de grupos funcionais (SILVA e SILVESTRE, 2003; BHASKAR et al., 2007).

Segundo Sgarbieri (1996), propriedades funcionais são todas as propriedades do alimento ou componentes dos alimentos, incluindo as nutricionais que possam influenciar a sua aceitação e utilização. As propriedades funcionais podem variar de acordo com o grau de hidrólise, já que se referem ao comportamento físico ou desempenho das proteínas nos alimentos e estes refletem as interações que são influenciadas pela composição de proteínas, sua estrutura e/ou conformação, tamanho molecular, associações intermoleculares de proteínas e outros ingredientes (KRISTINSSON & RASCO, 2000). Portanto, o grau de hidrólise influencia a solubilidade, capacidade de retenção de água, capacidade de retenção de óleo e as propriedades emulsificantes e estas definem a utilização do hidrolisado, desta forma é de extrema importância a escolha da enzima e do grau de hidrólise fornecido pela mesma (FURTADO et al., 2001).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de diferentes enzimas proteolíticas (Papaína[®], Flavourzyme[®] e Protamex[®]) sobre as propriedades funcionais de hidrolisados proteicos de carne mecanicamente separada (CMS) de frango e de carne manualmente desossada (CMD) de frango.

Materiais e Métodos

Os experimentos foram todos realizados nos laboratórios do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) /RS.

Material

As matérias-primas utilizadas foram a carne mecanicamente separada (CMS) de frango e a estrutura óssea oriunda da desossa manual de frangos, aqui denominada de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango congelada, obtida de animais abatidos com aproximadamente 42 dias e com peso médio de 2,5 kg, adquiridas de um abatedouro da região sul do Brasil. Antes da sua utilização a mesma foi descongelada sob temperatura de

refrigeração e cortada em pedaços menores com faca de aço inox para facilitar sua homogeneização durante o tempo de hidrólise. Para a realização da composição proximal da carne aderida nesta estrutura utilizou-se uma faca de aço inox comum para retirá-la e posteriormente homogeneizá-la em liquidificador. As amostras de CMS e CMD apresentaram um pH médio durante o experimento de 6,42 e 6,34, respectivamente.

Enzimas

Foram utilizadas três enzimas, a papaína comercialmente pura denominada Papain, From Papaya Látex-1,5 units/MG solid (Sigma Aldrich[®]), que é uma cisteína protease da família C1-peptidase. Foi utilizada também a Flavourzyme1000 L[®] que é uma exopeptidase com uma atividade de 1000 LAPU/g. Uma LAPU (Unidade Leucina Aminopeptidase) é a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de leucina- ρ -nitroanilida por minuto. A terceira enzima testada foi Protamex[®] que é uma enzima proteolítica produzida por fermentação submersa de *Bacillus licheniformes* e *Bacillus amyloliquefaciens* com atividade declarada de 1,5 AU-NH/g. As duas últimas enzimas mencionadas foram fornecidas pela Novozymes Latina Americana Ltda.

Processo de obtenção do hidrolisado proteico

Condições de Hidrólise

Para a realização do processo de hidrólise foram utilizadas 250 g de CMS e 250g de carcaça manualmente desossada (CMD) /g ou mL de enzima e acrescidas de 500 mL de água destilada (1:2) previamente aquecida e colocadas em banho termostático (Banho Ultratermostático Marconi modelo MA 184). As reações enzimáticas foram conduzidas à temperatura e pH de máxima atividade catalítica de cada enzima de acordo com a literatura e estão descritas na Tabela 1 (OGAWA; MAIA, 1999; CÂNDIDO; SGARBIERI, 2003). O pH das enzimas Flavourzyme e Protamex foram ajustados com solução de fosfato de sódio 0,2 M. Durante a hidrólise as amostras e as enzimas foram continuamente agitadas com agitador mecânico (Agitador Marconi modelo MA 039) durante o tempo de hidrólise (120 minutos). Após a hidrólise da CMS e da CMD, os hidrolisados coletados em tempos de 60 e 120 minutos foram filtrados em uma tela plástica com abertura de malha de 10 mesh, filtrados novamente em uma gaze e depois centrifugados a 4000 rpm, por 10 minutos em uma

centrifuga (Cetribio-Servilab) para remover todas as partículas sólidas (fundo) e a gordura (camada superior).

A proteína hidrolisada foi então aquecida a 95°C por 15 minutos para inativar a enzima, em seguida foi esfriada a temperatura ambiente, congelada e então liofilizada a uma temperatura de -54°C em liofilizador (LD 1500 Terroni).

Tabela 1 – Sistemas enzimáticos de hidrólise

Enzimas	[E]:[S] ^a	pH ^b	T°C ^c	Tempo (min.) ^d
Papaína	1:250	6,5	60	120
Flavourzyme	1:250	7,0	50	120
Protamex	1:250	7,0	50	120

^aRelação Enzima/Substrato (p/p); ^bpH ótimo de ação das enzimas; ^cTemperatura ótima de ação das enzimas; ^dTempo total de hidrólise

Fonte: Elaboração dos autores.

Composição proximal dos hidrolisados liofilizados

A composição proximal dos hidrolisados obtidos de diferentes enzimas e matérias-primas foi determinada de acordo com a metodologia recomendada pela AOAC (1995). A quantidade de proteína presente foi determinada pelo método de determinação de nitrogênio total, Kjeldahl (N x 6,25); cinzas pelo método gravimétrico em mufla (550-600 °C) e o teor de umidade pelo método gravimétrico em estufa (105 °C). Para a determinação dos lipídios foi utilizada o método de Bligh & Dyer (1959).

Determinação do Grau de Hidrólise (GH)

Alíquotas de hidrolisados durante os tempos indicados (60 e 120 min.) foram retiradas e a reação foi inativada com adição de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Após repouso de 10 minutos e filtração para a remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA, as proteínas solúveis foram quantificadas pelo método de Lowry et al. (1951), expresso em mg de albumina. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro (Modelo SP-220–Biospectro) a 650 nm. O grau de hidrólise foi medido segundo método descrito por Hoyle e Merrit (1994) e por Liceaga-Gesualdo e Li-Chan (1999), sendo expresso como percentagem de proteínas solúveis no TCA em relação à quantidade de proteína inicial total, e calculado em mg/g, segundo a Equação 1.

(1)

$$GH = \frac{\text{Proteína Solúvel em TCA 10\% X 100}}{\text{Proteína Total da Amostra}}$$

Propriedades funcionais dos hidrolisados enzimáticos

Solubilidade proteica

Para a realização do teste de solubilidade proteica foi utilizada a metodologia descrita por Morr *et al.* (1985) com variação de pH na faixa de 3 a 11. Uma amostra de 500 mg foi homogeneizada com 2 mL de solução de NaCl 0,1 M. A seguir adicionou-se 40 mL de tampão fosfato em pH 3, 5, 7, 9 e 11, a suspensão foi mantida sob agitação por 45 minutos em agitador magnético (Fisaton) e o volume foi completado em balão volumétrico de 50 mL. A suspensão foi centrifugada a 960 g por 30 minutos e no sobrenadante foi determinada a concentração de proteínas solúveis pelo método de Lowry *et al.* (1951). A porcentagem de proteína solúvel foi calculada de acordo com a Equação 2.

(2)

$$PS(\%) = \frac{\left[A \left(\frac{mg}{mL} \right) 50 \right]}{\left[W (mg) S / 100 \right]}$$

onde: P.S = teor de proteínas solúveis presentes na amostra [%]; A = concentração proteica do sobrenadante [mg/mL]; W = peso da amostra [mg]; S = concentração de proteína na amostra [%].

Capacidade de retenção de água

Para a realização da capacidade de retenção de água (CRA) foi utilizada a metodologia descrita por Regenstein *et al.* (1984) com algumas modificações. Dispersões proteicas a 1% foram homogeneizadas com 2 mL de solução de NaCl 0,1 M e 38 mL de tampão fosfato em pH 3, 5, 7, 9 e 11. A dispersão proteica foi submetida à agitação por 15 min e centrifugada a 960 g por 25 min. As proteínas que se solubilizaram foram quantificadas no sobrenadante pelo método de Lowry *et al.* (1951).

Capacidade de retenção de óleo

Para a realização do teste da capacidade de retenção de óleo (CRO) foi utilizado a metodologia descrito por Fonkwe e Singh (1996). Homogeneizou - se um grama de proteína hidrolisada com 20 mL de óleo vegetal de canola e submeteu-se a agitação por 10 minutos em agitador magnético (Fisaton), a suspensão foi centrifugada a 2272 g por 15 minutos. O resultado foi expresso em volume de óleo retido pela quantidade de proteína total presente na amostra de acordo com a Equação 3.

(3)

$$\text{CRO} = \frac{\text{óleo retido (mL)}}{\text{massa proteína (g)}}$$

Propriedades emulsificantes

A capacidade emulsificante e a estabilidade de emulsão foram determinadas segundo o método descrito por Okezie e Bello (1988), com algumas modificações citadas por Zaravese et al.,(2009). Um grama de proteína foi homogeneizada com 34 mL de solução de NaCl 3% e foi submetida à agitação em agitador (Agitador mecânico Fisaton) e iniciou-se a adição de óleo vegetal (canola) através de uma bureta até formar a emulsão. O resultado foi expresso em volume de óleo gasto para formar a emulsão pela quantidade total de amostra.

A determinação da estabilidade da emulsão foi determinada através do procedimento de aquecimento da emulsão formada em banho-maria (Banho Ultratermostatizado Marconi modelo MA 184) a 80 °C por 30 minutos, resfriada em água corrente por 15 minutos e centrifugada a 240 g por 15 minutos. A estabilidade de emulsão foi expressa em porcentagem da relação entre o volume da camada emulsificada remanescente e o volume total da camada emulsificada.

Resultados e discussão

Composição proximal dos hidrolisados liofilizados

A composição proximal dos hidrolisados liofilizados obtidos de diferentes matérias-primas está apresentada na Tabela 2.

Os teores de umidade apresentados pelos hidrolisados liofilizados variaram estatisticamente ($p \leq 0,05$) entre as enzimas e entre as matérias-primas utilizadas. Os valores apresentados concordam com diversos trabalhos realizados com proteína hidrolisada de peixes, que apresentam teores de umidade inferiores a 10% (OVISSIPOUR et al., 2009; CHALAMAIAH et al., 2010; FOH et al., 2011). Os baixos percentuais de umidade apresentados pelos hidrolisados protéicos são determinados pelas metodologias de secagem, assim como pelo tipo de amostra empregada (BUENO-SOLANO et al., 2009).

Os teores de cinzas também variaram estatisticamente ($p \leq 0,05$) entre as enzimas e entre as matérias-primas utilizadas.

As elevadas concentrações de cinzas para os hidrolisados obtidos da CMS e CMD com as enzimas Flavourzyme e Protamex, justificam-se pelo ajuste do pH no início do processo de hidrólise e também pela utilização de estabilizantes pela indústria produtora das enzimas, como o cloreto de potássio na Flavourzyme e cloreto de sódio na Protamex. Na hidrólise com a papaína a adequação de pH não foi necessária, já que a CMS e a CMD utilizada apresentavam valores de pH adequados ao pH ótimo de ação desta enzima que é entre de 5,0-8,0 (BENITEZ et al., 2008).

Um elevado teor de cinzas é considerado como uma desvantagem para as proteínas hidrolisadas limitando as suas aplicações industriais (SHAHIDI et al., 1995; SLIZYTE et al., 2005; PICOT et al., 2006).

Tabela 2 – Composição proximal dos hidrolisados proteicos de CMS e CMD liofilizados, obtidos através da hidrólise com diferentes enzimas proteolíticas.

Enzima	Umidade (%)		Cinzas (%)		Lipídeos (%)		Proteína (%)		Valor CAL (Kcal/100g)	
	CMS	CMD	CMS	CMD	CMS	CMD	CMS	CMD	CMS	CMD
Papaína	4,70 ^{bA} ±0,69	4,58 ^{cA} ±0,15	5,08 ^{cA} ±0,06	4,81 ^{cB} ±0,03	10,34 ^{aA} ±0,77	6,81 ^{aB} ±0,63	77,81 ^{aA} ±1,80	79,36 ^{aA} ±0,32	412,55 ^{aA} ±3,81	396,47 ^{aB} ±2,69
Flavourzyme	8,13 ^{aB} ±0,03	8,51 ^{aA} ±0,24	12,20 ^{aB} ±0,16	12,86 ^{aA} ±0,06	8,45 ^{bA} ±0,55	5,45 ^{aB} ±0,47	70,20 ^{bA} ±1,01	67,86 ^{bB} ±0,66	360,93 ^{cA} ±3,24	341,79 ^{bB} ±2,44
Protamex	3,58 ^{cB} ±0,04	6,23 ^{bA} ±0,31	10,38 ^{bB} ±0,03	11,07 ^{bA} ±0,09	7,28 ^{bA} ±0,26	3,27 ^{bB} ±0,97	78,55 ^{aA} ±0,15	68,21 ^{bB} ±0,62	380,53 ^{bA} ±1,18	347,12 ^{bB} ±3,42

Médias dentro da mesma coluna com letras minúsculas, e da mesma linha (para cada determinação) com letras maiúsculas com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaboração dos autores.

O teor de lipídeos dos hidrolisados liofilizados obtidos da CMS não variaram entre os obtidos com a Flavourzyme e Protamex, mas estes foram significativamente diferentes ($p < 0,05$), do hidrolisado obtido com a papaína, porém todos apresentaram teor de lipídeos menores que a matéria-prima inicial (18,36%). O conteúdo de lipídeos dos hidrolisados liofilizados obtidos a partir da CMD não variaram entre a Papaína e Flavourzyme, mas estes foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) do hidrolisado obtido com a enzima Protamex, contudo todos se apresentaram menores que o teor de lipídeos da matéria-prima inicial (CMD) (26,79%).

A comparação entre as matérias-primas mostra que ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a CMS e a CMD, e os hidrolisados obtidos com a CMD apresentaram teores menores de lipídios, mesmo sendo originários de uma matéria-prima mais rica em lipídeos, pois se optou pela não retirada da pele da carcaça. A explicação para este acontecimento, possivelmente deva-se ao fato de que o processo de centrifugação pode ter proporcionado uma retirada maior de gordura, já que esta possui um ponto de fusão maior, principalmente devido à quantidade de estearina, presente na pele dos frangos (CENTENARO; FURLAN; SOUZA-SOARES, 2008), o que proporciona uma maior solidificação durante a centrifugação realizada ao final do processo de hidrólise, proporcionando uma remoção mais eficiente dos lipídeos.

Segundo Nilsang et al. (2005), com o processo de centrifugação uma parte dos lipídios é excluída juntamente com as proteínas insolúveis, o que pode aumentar a estabilidade química durante o armazenamento do hidrolisado.

O conteúdo de proteína dos hidrolisados liofilizados provenientes da CMS e obtidos com uso da Papaína e da Protamex não diferiram estatisticamente, porém o teor de proteínas do hidrolisado obtido com a Flavourzyme apresentou-se menor e diferiu ($p < 0,05$) de ambos. Os teores de proteínas dos hidrolisados liofilizados obtidos da CMD com as enzimas Flavourzyme e Protamex mostram que os resultados foram semelhantes, porém diferiram ($p < 0,05$) significativamente do resultado do hidrolisado obtido com a Papaína. Os teores de proteínas apresentados pelos hidrolisados apresentaram-se dentro dos valores relatados em estudos que indicam como matéria prima cabeças e carne mecanicamente separada de frango (SALES et al., 1991; SURÓWKA; FIK, 1994; SOARES et al., 2000).

Grau de Hidrólise

Os resultados do grau de hidrólise da CMS e CMD com as diferentes enzimas estão apresentados na Tabela 3.

O grau de hidrólise proporcionado pelas enzimas aumentou com o aumento do tempo de reação de hidrólise. Durante os primeiros 60 minutos de hidrólise para a CMS somente o grau de hidrólise com a enzima Flavourzyme foi estatisticamente menor ($p \leq 0,05$) quando comparado com as outras enzimas. Porém, para a CMD as três enzimas utilizadas apresentaram valores para o grau de hidrólise significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) nos dois tempos de hidrólise. O grau de hidrólise encontrado para a Flavourzyme assemelha-se ao encontrado por Santos (2006), em um estudo com esta enzima, na elaboração de hidrolisado de Cabrinha (*Prionotus punctatus*) nas mesmas condições reacionais utilizadas neste trabalho, cujo grau de hidrólise encontrado foi de 24,7%.

A menor eficiência apresentada pela Flavourzyme nas duas matérias-primas indica que esta exopeptidase necessita de um tempo maior para obter melhores resultados de hidrólise.

Entre a CMS e a CMD aos 60 e aos 120 minutos os valores para o grau de hidrólise variaram significativamente ($p \leq 0,05$), ou seja, para as três enzimas o grau de hidrólise sempre foi maior para a CMS, quando comparado com a CMD.

O menor grau de hidrólise para a CMD com todas as enzimas utilizadas pode estar relacionado com o percentual de lipídeos apresentado por esta matéria-prima oriunda da desossa manual, que apresentou um teor médio de 26,79% de lipídeos, enquanto que a CMS apresentou 18,36% de lipídeos.

Tabela 3 – Grau de hidrólise para CMS e CMD durante os tempos de 60 e 120 minutos de hidrólise para as diferentes enzimas utilizadas em condições estabelecidas de pH e temperatura.

Enzima	Tempo de Hidrólise (minutos)			
	60'		120'	
	CMS	CMD	CMS	CMD
Papaína	57,93 ^{aA} ±5,88	39,25 ^{bB} ±4,97	66,20 ^{aA} ±2,76	43,19 ^{bB} ±4,69
Flavourzyme	24,67 ^{bA} ±3,82	16,72 ^{cB} ±1,89	29,46 ^{bA} ±4,78	20,25 ^{cB} ±4,33
Protamex	54,70 ^{aA} ±8,50	47,12 ^{aB} ±5,27	61,21 ^{aA} ±4,34	51,31 ^{aB} ±4,61

Médias dentro da mesma coluna com letras minúsculas, e da mesma linha (para cada tempo de hidrólise) com letras maiúsculas com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaboração dos autores.

De acordo com Slyztye et al. (2005), o processo de hidrólise pode ser influenciado negativamente pelo teor de lipídios devido a formação de complexos proteína/lipídios mais resistentes ao rompimento enzimático. Estes autores ao analisarem a composição de diferentes frações obtidas após a hidrólise de bacalhau (*Gadus morhua*) com as enzimas Flavourzyme e Neutrase observaram que matérias-primas com elevado conteúdo de lipídios resultavam em um hidrolisado com menor quantidade de proteína solubilizada.

Schmidt e Salas Mellado (2009) observaram que o grau de hidrólise era menor quando o substrato utilizado (coxa e peito de frango) possuía maior teor de lipídeos e também de colágeno e que este fato era mais evidente com a enzima Flavourzyme do que com a Alcalase.

No final da hidrólise (120 minutos) para a CMD observam-se valores de 43%, 20% e 51% de GH para a Papaína, Flavourzyme e Protamex, respectivamente. Com o mesmo substrato e a mesma quantidade de enzima, o GH apresentado pela Protamex foi significativamente maior ($p < 0,05$), que pela Papaína e pela Flavourzyme.

Nas reações de hidrólise de atum (*Katsuwonus pelamis*) submetido a diferentes proteases industriais (Alcalase[®], Protamex[®], Neutrase[®] e Flavourzyme[®]), constatou-se um maior grau de hidrólise para a Alcalase[®], seguido da Protamex[®], Flavourzyme[®] e Neutrase[®] (HERPANDI et al., 2012).

Propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos

Propriedades funcionais podem ser definidas como o comportamento físico-químico global de desempenho de proteínas em sistemas alimentares durante o processamento, armazenagem e consumo (Hall & Ahmad, 1992). Segundo Herpandi et al. (2012) a hidrólise de proteínas é uma técnica utilizada para melhorar a funcionalidade das proteínas.

Solubilidade proteica

A solubilidade proteica é uma das mais importantes propriedades físico-químicas dos hidrolisados proteicos, pois determina suas aplicações industriais, na produção de alimentos e de sucos de frutas ou bebidas para crianças, uma vez que permite o controle da osmolaridade do produto, e a mesma propriedade é importante na produção de substâncias destinadas a administração parenteral ou gástrica (NEKLYUDOV; IVANKIN; BERDUTINA; 2000).

Além disto, uma boa solubilidade das proteínas torna-se necessária, especialmente na formação de emulsões, espumas e géis porque as proteínas solúveis proporcionam uma

dispersão homogênea das moléculas em sistemas coloidais e melhoram as propriedades superficiais (ZAYAS, 1997).

A Tabela 4 mostra os percentuais de solubilidade proteica dos hidrolisados liofilizados oriundos da CMS e da CMD obtidos com as enzimas Papaína, Flavourzyme e Protamex nos pHs 3, 5, 7, 9 e 11.

A solubilidade proteica do hidrolisado liofilizado obtido com a Papaína foi significativamente maior ($p < 0,05$) para a CMS, nos pHs 3,0 e 9,0 quando comparado com a CMD, já que com esta matéria-prima o grau de hidrólise foi menor. Os percentuais de solubilidade protéica apresentados pela Papaína na CMS assemelham-se aos valores relatados por Fonkwe & Singh (1996), que utilizando Papaína e as mesmas condições de hidrólise para um substrato diferente (resíduos de carne mecanicamente separada de peru) apresentaram valores de solubilidade protéica superiores a 90%.

Os menores valores de solubilidade protéica foram obtidos com a Flavourzyme e com a Protamex. Não ocorreram alterações significativas ($p < 0,05$) da solubilidade protéica entre as matérias-primas CMS e CMD com a enzima Flavourzyme, já com a Protamex esta diferença ($p < 0,05$), ocorreu nos pHs 5,0 e 7,0 .

Vários estudos afirmam ocorrer uma correlação entre o grau de hidrólise e a solubilidade das proteínas, pois a hidrólise enzimática diminui o tamanho molecular e a hidrofobicidade, assim como os grupos polares e ionizáveis dos hidrolisados proteicos (QUAGLIA & ORBAN, 1987; TURGEON & GAUTHIER, 1990; SHAHIDI et al., 1995; CÂNDIDO; SGARBIERI, 2003; SOUISSI et al., 2007).

Uma característica adicional importante dos hidrolisados proteicos é a sua estabilidade térmica mais elevada em comparação com a proteína nativa, o que é especialmente relevante na utilização do calor empregado nos processos de esterilização de produtos contendo hidrolisados (HAQUE & MOZAFFAR, 1992).

Tabela 4 – Solubilidade proteica dos hidrolisados liofilizados em diferentes pHs, obtidos de CMS e de CMD através da utilização de enzimas proteolíticas.

Enzima	pH 3,0		pH 5,0		pH 7,0		pH 9,0		pH 11,0	
	CMS	CMD	CMS	CMD	CMS	CMD	CMS	CMD	CMS	CMD
Papaína	85,19 ^{aA} ±2,02	69,59 ^{aB} ±3,17	81,61 ^{aA} ±17,81	72,24 ^{aA} ±1,66	82,24 ^{aA} ±9,50	69,12 ^{aA} ±0,69	92,55 ^{aA} ±0,73	70,13 ^{aB} ±7,99	84,34 ^{aA} ±15,67	69,66 ^{aA} ±1,61
Flavourzyme	48,10 ^{bA} ±4,64	54,08 ^{bA} ±5,36	60,81 ^{aA} ±13,94	54,82 ^{bA} ±5,98	52,25 ^{bA} ±9,82	57,26 ^{abA} ±8,12	62,11 ^{bA} ±8,08	61,94 ^{aA} ±15,74	65,92 ^{aA} ±6,05	63,90 ^{aA} ±15,02
Protamex	59,10 ^{bA} ±13,35	47,76 ^{bA} ±0,58	54,89 ^{aA} ±6,21	44,43 ^{cB} ±3,05	72,04 ^{abA} ±5,82	54,12 ^{bB} ±5,45	67,06 ^{bA} ±3,33	56,06 ^{aA} ±12,82	69,19 ^{aA} ±2,04	60,71 ^{aA} ±12,44

Médias dentro da mesma coluna com letras minúsculas, e da mesma linha (para cada pH) com letras maiúsculas com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaboração dos autores.

Capacidade de retenção de óleo

A capacidade de retenção de óleo varia em função do número de grupos hidrofóbicos expostos da proteína. Ocorre uma afinidade entre as cadeias laterais não polares das proteínas que têm afinidade com as cadeias hidrofóbicas da molécula de gordura e desta forma colaboram para a absorção de gordura (DONADEL; PRUDÊNCIO-FERREIRA, 1999).

Observa-se que os valores de capacidade de retenção de óleo (Tabela 5) são significativamente ($p < 0,05$), menores para os hidrolisados que possuem maior grau de hidrólise, neste caso os obtidos com a Papaína e a Protamex.

Vários trabalhos compararam a capacidade de retenção de óleo entre proteínas intactas e hidrolisados proteicos, e concluíram que estes apresentavam uma baixa hidrofobicidade, em relação a proteína não hidrolisada, pois quando as proteínas apresentam grandes regiões hidrofóbicas ocorre a facilitação da sua interação com o óleo (CHEFTEL et al., 1985; GBOUGORI et al., 2004; WASSWA et al., 2007; CENTENARO et al., 2009).

A origem da matéria-prima não interferiu significativamente ($p < 0,05$), para a capacidade de retenção de óleo dos hidrolisados liofilizados obtidos com a Papaína e a Flavourzyme, já no hidrolisado obtido com a Protamex ocorreram diferenças ($p < 0,05$), entre as matérias-primas utilizadas. Fonkwe & Singh (1996), obtiveram valores de capacidade de retenção de óleo menores (1,0mL/g) que os apresentados neste trabalho para um hidrolisado obtido dos resíduos de carne mecanicamente separada de peru.

Centenaro et al. (2009), obtiveram hidrolisados de corvina (*Micropogonias furnieri*) com a enzima Alcalase 2.4L, e nos ensaios que tiveram o menor e o maior valor de grau de

hidrólise (12,2 e 43,7%, respectivamente), apresentaram o maior e o menor valor de capacidade de retenção de óleo (3,9 e 1,2 mL óleo/g proteína) respectivamente.

Tabela 5 – Capacidade de retenção de óleo (mL de óleo/g de hidrolisado) dos hidrolisados proteicos obtidos de CMS e de CMD liofilizados.

Enzima	Capacidade de retenção de óleo (mL/g)	
	CMS	CMD
Papaína	1,94 ^{bA} ±0,57	2,02 ^{bA} ±0,66
Flavourzyme	3,10 ^{aA} ±1,08	3,10 ^{aA} ±0,37
Protamex	0,99 ^{cB} ±0,30	1,61 ^{bA} ±0,76

Médias dentro da mesma coluna com letras minúsculas, e da mesma linha com letras maiúsculas com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaboração dos autores.

Capacidade de Retenção de Água

A Tabela 6 mostra os resultados da capacidade de retenção de água em diferentes pHs.

A quantidade de água ligada a proteína depende de vários fatores, principalmente da sua composição, conformação, número de grupos polares expostos, presença de sais, pH, etc (KINSELLA,1984).

A matéria-prima influenciou significativamente ($p < 0,05$), a capacidade de retenção de água dos hidrolisados obtidos com as três enzimas nos diferentes pHs.

O hidrolisado que apresentou os maiores valores de capacidade de retenção de água foi o obtido com a enzima Flavourzyme na CMS. Isto está de acordo com os resultados encontrados por Schmidt e Salas-Mellado (2009), que atribuem isto às características da Flavourzyme por possuir atividade especialmente exopeptídica, e desta forma liberar aminoácidos com grupo carboxi-terminal, portanto, os hidrolisados obtidos com esta enzima possuem alto conteúdo de aminoácidos livres e, principalmente devido ao menor grau de hidrólise (Tabela 3), devem possuir peptídeos de alto peso molecular que irão determinar melhores propriedades de capacidade de retenção de água.

Nos estudos realizados por Zavarese et al. (2009), os resultados apresentados com o uso da Flavourzyme foram superiores aos das outras enzimas utilizadas no estudo (Alcalase e Novozym), indicando que o aumento da capacidade de retenção de água foi inversamente proporcional ao grau de hidrólise.

Segundo Ogawa e Maia (1999), a velocidade do grau de hidrólise é uma variável do processo que pode ser controlada e pode influenciar as características funcionais do produto final, como solubilidade, dispersibilidade, capacidade de retenção de água e emulsificação.

Alguns estudos mostraram que os hidrolisados de proteínas de peixes podem também contribuir para aumentar a capacidade de retenção de água em formulações alimentares, o que pode contribuir para a aceitabilidade sensorial do produto no qual ele é introduzido (RAVALLEC-PLÉ et al., 2001; SLIZYTE et al., 2009).

Tabela 6 – Capacidade de retenção de água dos hidrolisados proteicos liofilizados obtidos de CMS e de CMD, através da utilização de enzimas proteolíticas, Papaína[®], Flavourzyme[®] e Protamex[®].

Enzima	pH 3,0		pH 5,0		pH 7,0		pH 9,0		pH 11,0	
	CMS	CMD	CMS	CMD	CMS	CMD	CMS	CMD	CMS	CMD
Papaína	5,19 ^{aA} ±0,03	1,20 ^{abB} ±0,28	5,35 ^{aA} ±0,08	2,14 ^{aB} ±1,87	6,31 ^{aA} ±0,09	0,76 ^{aB} ±0,74	1,64 ^{bA} ±0,03	1,28 ^{aA} ±0,39	6,16 ^{aA} ±0,03	0,24 ^{aB} ±0,20
Flavourzyme	5,28 ^{aA} ±0,03	2,50 ^{aB} ±0,62	5,69 ^{aA} ±0,09	1,02 ^{aB} ±0,60	5,07 ^{aA} ±0,01	1,17 ^{aB} ±0,40	4,85 ^{aA} ±0,03	1,32 ^{aB} ±0,21	6,62 ^{aA} ±0,03	0,66 ^{aB} ±0,31
Protamex	1,89 ^{bA} ±0,03	0,70 ^{bB} ±0,64	1,58 ^{bA} ±0,08	0,84 ^{aA} ±0,87	1,58 ^{bA} ±0,09	0,79 ^{aA} ±0,51	2,82 ^{bA} ±0,03	1,52 ^{aB} ±0,74	2,52 ^{bA} ±0,03	1,44 ^{aA} ±1,27

Médias dentro da mesma coluna com letras minúsculas, e da mesma linha com letras maiúsculas com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaboração dos autores.

Propriedades Emulsificantes

A Tabela 7 apresenta a capacidade emulsificante e a estabilidade de emulsão dos hidrolisados de CMS e de CMD obtidos com as enzimas Papaína, Flavourzyme e Protamex.

O hidrolisado obtido com a enzima Flavourzyme apresentou uma capacidade emulsificante significativamente maior ($p < 0,05$) (9,27mL/g), em relação aos hidrolisados obtidos com a Papaína e a Protamex, oriundos da CMS (Tabela 7).

Zavarese et al. (2009), em hidrolisado proteico de Cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtido por diferentes proteases microbianas apresentaram 37,3mL de óleo/g de proteína de capacidade emulsificante com a enzima Flavourzyme, neste mesmo estudo os pesquisadores relataram 23,7% de estabilidade de emulsão para esta enzima, valor muito próximo ao encontrado para a estabilidade de emulsão para a CMD com esta enzima (25,92%).

Para a CMD, o hidrolisado que apresentou maior ($p < 0,05$) capacidade emulsificante foi aquele obtido com a Papaína, seguido dos obtidos com a Flavourzyme e a Protamex.

A capacidade emulsificante das proteínas é de extrema importância para a indústria de alimentos, principalmente a carne. Vários estudos relacionam a capacidade emulsificante dos

hidrolisados proteicos com o grau de hidrólise destes, sendo que esta propriedade é inversamente proporcional ao grau de hidrólise (QUAGLIA; ORBAN, 1990; MAHMOUD; MALONE; CORDLE, 1992; KRISTINSSON; RASCO, 2000; GBOGOURI et al., 2004).

Nielsen (1997) estudou as funcionalidades das proteínas hidrolisadas e concluiu que a hidrólise parcial das proteínas normalmente aumenta o número de grupos polares e hidrofílicos, diminui o peso molecular, altera a estrutura globular das proteínas podendo expor maior número de grupos hidrofóbicos e que estas alterações podem influenciar as propriedades emulsificantes dos hidrolisados.

O tamanho dos peptídeos também influencia a estabilidade da emulsão e desta forma os peptídeos maiores promovem uma maior estabilidade da emulsão (PANYAM; KILARA, 1996).

Além do grau de hidrólise a concentração de proteína parece influenciar a capacidade de emulsificação e a estabilidade de emulsão, diminuindo com o aumento desta. Segundo Ktari et al. (2012), em baixas concentrações de proteína, a proteína de adsorção na interface óleo-água é controlada por difusão. Em concentrações mais elevadas, as proteínas exibem problemas característicos, incluindo agregação, precipitação, geleificação e especialmente o aumento da viscosidade que pode limitar interações proteína-proteína necessárias para formar a membrana interfacial em torno das gotículas de óleo.

O hidrolisado obtido a partir da CMD com a Protamex (Tabela 7) apresentou o maior ($p < 0,05$) percentual (42,10%) de estabilidade de emulsão, seguido dos obtidos com a Papaína e a Flavourzyme.

Kristinsson e Rasco (2000), obtiveram em torno de 50% de estabilidade de emulsão para hidrolisados proteicos de pescado com as enzimas Alcalase e Flavourzyme e esta estabilidade foi maior para o hidrolisado com menor grau de hidrólise.

Tabela 7 – Resultados da capacidade emulsificante (mL óleo/g de amostra) e estabilidade da emulsão (%) dos hidrolisados liofilizados proteicos obtidos de CMS e de CMD de frango.

Enzima	Propriedades emulsificantes			
	Capacidade emulsificante (mL/g)		Estabilidade da emulsão (%)	
	CMS	CMD	CMS	CMD
Papaína	5,80 ^{CB} ±0,47	7,76 ^{AA} ±0,48	35,42 ^{AA} ±0,87	29,95 ^{BB} ±0,70
Flavourzyme	9,27 ^{AA} ±0,67	6,56 ^{BB} ±0,63	18,41 ^{CB} ±0,79	25,92 ^{CA} ±0,40
Protamex	7,50 ^{BA} ±0,45	6,01 ^{CB} ±0,87	29,26 ^{BB} ±0,58	42,10 ^{AA} ±0,37

Médias dentro da mesma coluna com letras minúsculas, e da mesma linha (por propriedade) com letras maiúsculas com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaboração dos autores.

Conclusão

Verificou-se que no presente estudo os hidrolisados proteicos obtidos da CMS e da CMD, apresentaram alto conteúdo protéico, com todas as enzimas utilizadas.

As propriedades funcionais dos hidrolisados obtidos da CMS e CMD mostraram-se diferenciadas para cada enzima e matéria-prima, principalmente pelo grau de hidrólise individualizado apresentado pelas diferentes enzimas.

A solubilidade proteica aumentou com o aumento do grau de hidrólise e o hidrolisado que apresentou maior solubilidade foi com a CMS obtido com a enzima Papaína.

A maior capacidade de retenção de água foi apresentada pelo hidrolisado obtido com a enzima Flavourzyme na CMS, e esta propriedade é inversamente proporcional ao grau de hidrólise, igualmente a capacidade de retenção de óleo que foi maior para a Flavourzyme, nas duas matérias-primas utilizadas.

A capacidade emulsificante também foi maior para a Flavourzyme na CMS, já que esta propriedade também depende do grau de hidrólise.

Referencial bibliográfico

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 16th ed. Horowitz: Washington D.C., 1995.

BENÍTEZ, R.; IBARZ, A.; PAGAN, J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones, *Acta Bioquím Clín Latinoam*, v. 42, n. 2, pp. 227-36; 2008.

BHASKAR, N.; MODI, V. K.; GOVINDARAJU, K.; RADHA, C.; LALITHA, R. G.; Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. *Bioresource Technology*, England, v. 98, n. 2, p. 388-394, 2007.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J.; A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v. 37, n. 8, pp. 911-7, 1959.

BUENO-SOLANO, C.; LOPEZ-CERVANTES, J.; CAMPAS-BAYPOLI, O. N.; LAUTERIO-GARCIA, R.; ADAN-BANTE, N. P.; SANCHEZ-MACHADO, D. I. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. **Food Chemistry**, n. 112, pp. 671–675, 2009.

CÂNDIDO, L.M.B.; SGARBIERI, V.C. A hidrólise enzimática de tilápia do Nilo (*Oreochromus niloticus*) proteínas miofibrilares: efeitos sobre propriedades nutricionais e hidrofílico. **J. Sci. Food Agric.**, n. 83, pp. 937-944, 2003.

CHALAMAIAH, M.; NARSING RAO, G.; RAO, D. G.; JYOTHIRMAYI, T. Proteinhydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. **Food Chemistry**, n. 120, pp. 652–657, 2010.

CENTENARO, G. S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SALAS-MELLADO, M. Efeito da concentração de enzima e de substrato no grau de hidrólise e nas propriedades funcionais de hidrolisados protéicos de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1792-1798, 2009.

CENTENARO, G.S.; FURLAN, V.J.M.; SOUZA-SOARES, L.A. Gordura de frango: alternativas tecnológicas e nutricionais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n.3, p. 619-630, jul./set. 2008.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends Food Science and Technology**, v. 11, n. 7, p. 254-262, 2000.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). **Food chemistry**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1985. p. 245-369.

CHIANG, W. D.; SHIH, C. J.; CHU, Y. H. Functional properties of soy hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. **Food Chemistry**, v. 65, n. 2, p. 189-194, 1999.

DONADEL, M. E.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Propriedades funcionais de concentrado protéico de feijão envelhecido. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.19, n.3, p.380-386, 1999.

FOH, M. B. K.; KAMARA, M. T.; AMADOU, I.; FOH, B. M.; WENSHUI, X. Chemical and physicochemical properties of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish protein hydrolysates and concentrate. **International Journal of Biological Chemistry**, n. 5, pp. 21–36, 2011.

FONKWE, L.G.; SINGH, R.K. Protein recovery from mechanically Deboned Turkey residue by Enzymic Hydrolysis. **Process Biochemistry**, Watford, n. 6, pp.605-616,1996.

FROKJAER, S. Use of hydrolysate for protein supplementation. **Food Technology**, v. 48, n. 10, p. 86-88, 1994.

FURTADO, M.A.M.; GOMES, J.C.; SILVA, C.A.S.; ORNELLAS, C.B.; SILVESTRE, M.P.C. Propriedades funcionais de hidrolisados de proteína láctea co-precipitada. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.25, n.3, p.625-639, 2001.

GBOGOURI, G. A.; LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproduct hydrolysates. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 8, pp. 615–622, 2004.

HALL, G. M.; AHMAD, N. H. Functional properties of fish-protein hydrolysates. In: HALL, G.M. (Ed). **Fish processing technology**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1992. p. 249–274.

HAQUE, Z.U.; MOZAFFAR, Z. Casein hydrolysis, II Functional properties of peptides. **Food Hydrocolloids**, n. 5, pp. 559-571, 1992.

HERPANDI, HUDA N.; ROSMA, A.; WAN NADIAH, W. A. Degree of hydrolysis and free tryptophan content of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) protein hydrolysates produced with different type of industrial proteases. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 3, pp. 863-867, 2012.

HOYLE, N.T.; MERRIT, J.H. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, Chicago, v.59, n.1, p.76-79, 1994.

KRISTINSSON, H.G.; RASCO, B.A. Biochemical and functional properties of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline protease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 48, pp. 657-666 2000.

KTARI, N.; JRIDI, M.; BKHAIRIA, I.; SAYARI, N.; SALAH, R.B.; NASRI, M. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from muscle of zebra blenny (*Salaria basilisca*) obtained with different crude protease extracts. **Food Research International**, n. 49, pp. 747–756, 2012.

LICEAGA-GESUALDO, A. M.; LI-CHAN, E. C. Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*clupea harengus*). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, n. 6, p. 1000-1004, 1999.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p 265-275, 1951.

MAHMOUD, M. I.; MALONE, W. T., CORDLE, C. T. Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. **Journal of Food Science**, n. 57, pp. 1223–1229, 1992.

MORR, C. V. Composition, physicochemical and functional properties of reference whey protein concentrates. **Journal of Food Science**, n. 50, pp. 1406–1411, 1985.

NEKLYUDOV, A.D.; IVANKIN, A. N.; BERDUTINA, A. V. Properties and uses of protein hydrolysates (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, vol. 36, n. 5, pp. 452-459, 2000.

NILSANG,S.; LERTSIRI,S.; SUPHANTHARIA,M.; ASSAVANIG, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. **Journal of Food Engineering**, Westport, v.70, p.571-578, 2005.

NEVES, R.A.M.; MIRA, N.V.M. ; MARQUEZ, U.M. L.. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n.1, pp. 101-108, 2004.

OGAWA, N.B.P.; MAIA, E.L. **Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Varela, 1999. 430p.

OVISSIPOUR, M.; ABEDIAN KENARI, A.; MOTAMEDZADEGAN, A.; RASCO, B.; SAFARI, R.; SHAHIRI, H. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. **Food Chemistry**, n. 115, pp. 238–242, 2009.

OKEZIE, B.O.; BELLO, A.B. Physicochemical and functional properties of winged bean flour and isolate compared with soy isolate. **J Food Sci**, n. 53, pp. 450–454, 1988.

PANYAM, D., KILARA, A. Enchanting the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology International**, Cambridge, v.7, n.4, pp.120-125,1996.

PICOT, L.; BORDENAVE, S.; DIDELOT, S.; FRUITIER-ARNAUDIN, I.; SANNIER, F.; THORKELSSON, G. et al. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. **Process Biochemistry**, n. 41, pp. 1217–1222,2006.

QUAGLIA, G. B.; ORBAN, E. Enzymic solubilisation of proteins of sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 38, pp. 263–269, 1987.

QUAGLIA, G. B.; ORBAN, E. Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysate. **Journal of Food Science**, n. 55, pp. 1571–1573, 1619, 1990.

RAVALLEC-PLE, R.; GILMARTIN, L.; WORMHOUDT, A.V.; LEGAL, Y. Influence of the experimental conditions on the hydrolysis process in fish protein hydrolysates. In: HOFMAN, M.; THONART, P. (Eds.). **Engineering and manufacturing for biotechnology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2001. p. 51-58.

REGENSTEIN, J. M.; JAUREGUI, C. A.; BAKER, R. C. The effect of pH, polyphosphates and different salts on water retention properties of ground trout muscle. **Journal of Food Biochemistry**, n. 8, p. p. 123–131,1984.

SALES, A. M.; CARVALHO, A. C. V.; BALDINI, V. L. S.; GONÇALVES, J. R.; BERAQUET, J. N. Extração enzimática de proteína de resíduo de carne de frango mecanicamente separada. **Coletânea Ital**, Campinas, v.21, n.2, p.223-242, 1991.

SANTOS, S. D. **Obtenção e avaliação de hidrolisado enzimático obtido a partir de pescado de baixo valor comercial**. Dissertação (Mestrado). Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2006.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos. Propriedades – Degradações – Modificações. SP: Livraria Varela, 1996. 571p.

SHAHIDI, F.; XIAO-QING, H.; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, n. 53, 285–293, 1995.

SILVA, V. D. M.; SILVESTRE, M.P.C. Functional properties of bovine plasma intended for use as a functional ingredient in human food. **Food Sci. Technol.**, v. 37, n. 6, p. 709-718, 2003.

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

SLIZYTE, R.; DAUKSAS, E.; FALCH, E.; STORRO, I.; RUSTAD, T. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by products. **Process Biochemistry**, v. 40, n.3-4, p.1415-1424, 2005.

SOARES, L. H. B.; MARQUES, D. N.; ALBUQUERQUE, P. M.; AYUB, M. A. Z. Influence of some commercial proteases and enzymatic associations on the hydrolytic solubilization of deboned poultry meat proteins. **Food Science and Technology International**, London, v. 6, n. 4, p. 301-306, 2000.

SOUISSI, N.; BOUGATEF, A.; TRIKI-ELLOUZ, Y.; NASRI, M. Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. **Food Technology and Biotechnology**, n. 45, 187–194, 2007.

SURÓWKA, K.; FIK, M. Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. I. Application of pepsin to the production of protein hydrolysate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 65, n. 3, p. 289-296, 1994.

TURGEON, S. L.; GAUTHIER, S. F. Whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process: production and characterization. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 106–110, p. 157., 1990.

WASSWA, J.; TANG, J.; GU, X. H.; YUAN, X. Q.; Influence of the Extent of Enzymatic Hydrolysis on the Functional Properties of Protein Hydrolysates from Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Skin. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, pp. 1698-1704, 2007.

ZARRABIAN, S.; BUTS, J.P.; FROMONT, G.; TRAN, T.U.; MACRY, J.; MENDY, F.; ROGER, L.; CÈZARD, J.P. Effects of alimentary intact proteins and their oligopeptide hydrolysate on growth, nitrogen retention, and small bowel adaptation in inflammatory turpentine rat. **Nutrition**, v. 15, n. 6, p. 474-480, 1999.

ZAVAREZE, E.R.; SILVA, C.M.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNANDEZ, C. Funcionalidade de Hidrolisados Proteicos de Cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, v.32, n.7, p.1739-1743, 2009.

ZAYAS, J. F. **Solubility of proteins: functionality of proteins in food**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. (pp. 6–22).

4.4 Artigo 4

Em fase final de revisão pelos autores para ser submetido a uma revista

Conteúdo mineral de hidrolisados proteicos oriundos de carne mecanicamente separada e de carcaça manualmente desossada de frango obtidos a partir de hidrólise enzimática

Resumo

A utilização de hidrolisados proteicos em dietas especiais como fontes de proteínas e minerais vem ganhando espaço na indústria farmacêutica, de alimentos e até na nutricosmética. O objetivo deste trabalho foi avaliar o aporte mineral dos diferentes hidrolisados proteicos liofilizados a partir da carne mecanicamente separada (CMS) e de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango. Foram utilizadas três enzimas comerciais Papaína[®], Flavourzyme[®] e Protamex[®]. A hidrólise ocorreu em banho termostaticado com temperatura, tempo e pH controlados para cada uma das enzimas. Foi realizada a composição proximal dos hidrolisados liofilizados, grau de hidrólise e análise de minerais. Os hidrolisados proteicos liofilizados obtidos a partir da CMS e da CMD possuem minerais importantes para a manutenção da saúde, como Mg, Ca, Fe e Zn. Concluiu-se que os hidrolisados proteicos obtidos da CMS e da CMD possuem conteúdo proteico e mineral expressivo, caracterizando-se como uma matéria prima promissora na formulação de dietas especiais.

Palavras-chave: Hidrolisados proteicos. Minerais. Carne mecanicamente separada. Carne manualmente desossada.

Mineral content of protein hydrolysates derived from mechanically deboned meat and manually deboned chicken carcass obtained from enzymatic hydrolysis

Abstract

The use of protein hydrolysates on special diets as sources of protein and minerals has been gaining ground in the pharmaceutical, food and even in cosmetic nutrition industry. The aim of this study was evaluate mineral intake from different lyophilised protein hydrolysates from mechanically separated meat (MSM) and manually deboned chicken carcass (MDC). Three commercial enzymes were used: Papaína[®], Flavourzyme[®] and Protamex[®]. The hydrolysis occurred in a thermostatic bath with controlled temperature, time and pH for each of the enzymes. Proximal composition of lyophilized hydrolysates, degree of hydrolysis and mineral analysis were performed. The lyophilized protein hydrolysates obtained from MSM and MDC have important minerals for maintaining health, such as Mg, Ca, Fe and Zn. It was concluded that protein hydrolysates obtained from MSM and MDC have significant mineral and protein content, characterizing them as a promising raw material in the formulation of special diets.

Keywords: Protein hydrolysates. Minerals. mechanically deboned meat. Manually deboned meat.

Introdução

O Brasil produziu aproximadamente 13,058 milhões de toneladas de carne de frango em 2011, caracterizando um aumento de 6,8% em relação a 2010 (UBABEF, 2012). Aproximadamente 20% das carcaças de frango de corte frescas são transformadas em carne mecanicamente separada (CMS) de frango (NEGRÃO et al., 2005). Tanto a carne mecanicamente separada de frango (CMS) quanto à carcaça manualmente desossada (CMD) podem ser transformadas em hidrolisados proteicos.

A qualidade nutricional dos hidrolisados proteicos vem ganhando importância, pois sua aplicação clínica é expressiva para indivíduos com limitações pós-cirúrgicas ou no tratamento de pacientes que apresentem doenças ou condições clínicas e fisiológicas que prejudiquem o sistema digestivo, tais como: colite ulcerativa, fibrose cística, síndrome do intestino curto, fístulas, pancreatites, traumas severos e doença de Crohn (SCHIMIDL et al., 1994).

Neste sentido, a hidrólise enzimática tornou-se um importante bioprocesso para aumentar as propriedades físicas, químicas, funcionais e nutricionais em relação à proteína original. Estudos revelam que com a hidrólise são gerados peptídeos bioativos com inúmeras funções, tais como anti-hipertensiva, imunomoduladora, opióides, antioxidante, hipocolesterolêmica, e atividade quelante de minerais (VIOQUE et al, 2000; GOBBETTI et al, 2002).

Os minerais são elementos inorgânicos vastamente difundidos na natureza e que, no organismo, desempenham uma multiplicidade significativa de funções metabólicas que incluem ativação, regulação, transmissão e controle, tornando-se desta forma micronutrientes importantes na dieta humana e animal (WILLIAMS , 1997).

Além do aporte significativo de proteínas, vários estudos afirmam que os hidrolisados proteicos podem fornecer um grande número de peptídeos com capacidade quelante de metais e outras atividades biológicas a partir da hidrólise enzimática de várias proteínas alimentares, como proteínas de grão de bico (MEGÍAS et al., 2007; TORRES-FUENTES, ALAIZ, VIOQUE, 2012), proteína de soja (LV et al., 2009), proteínas do leite (KIM et al., 2007), proteínas do plasma sanguíneo suíno (LEE; SONG, 2009) e proteínas do girassol (MEGÍAS et al., 2008).

Os efeitos positivos destes peptídeos na absorção de minerais como o cálcio (CROSS, HUQ; REYNOLDS, 2007), o zinco (MIQUEL e FARRE, 2007), ferro (BOUHALLAB et al., 2002), e cobre (MEGÍAS et al., 2007), in vivo e in vitro têm sido investigados.

Esta particularidade torna os hidrolisados interessantes do ponto de vista tecnológico, já que este fato pode contribuir na formulação de alimentos enriquecidos com estes micronutrientes (TORRES-FUENTES, ALAIZ, VIOQUE, 2012)

As informações sobre o conteúdo mineral dos hidrolisados proteicos liofilizados obtidos a partir da CMS e da CMD são dados importantes que podem auxiliar nas formulações de dietas especiais, como por exemplo, dietas que possuem como objetivo recuperar ou manter o estado nutricional de um paciente.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o aporte mineral, composição proximal e o grau de hidrólise dos diferentes hidrolisados protéicos de carne mecanicamente separada (CMS) e de carne manualmente desossada (CMD) de frango produzidos com três enzimas proteolíticas Papaína[®], Flavourzyme[®] e Protamex[®].

Materiais e Métodos

Material

As matérias-primas utilizadas foram a carne mecanicamente separada (CMS) de frango e a estrutura óssea oriunda da desossa manual de frangos, denominada de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango congelada, obtida de animais abatidos com aproximadamente 42 dias e com peso médio de 2,5 kg, adquirida de um abatedouro da região sul do Brasil. Anteriormente a sua utilização a mesma foi descongelada sob temperatura de refrigeração e cortada em pedaços menores com faca de aço inox para facilitar sua homogeneização durante o tempo de hidrólise. Para a realização da composição proximal da carne aderida nesta estrutura utilizou-se uma faca de aço inox comum para retirá-la e posteriormente homogeneizá-la em liquidificador. As amostras de CMS e CMD apresentaram um pH médio durante o experimento de 6,42 e 6,34, respectivamente.

Enzimas

Foram utilizadas três enzimas, a papaína comercialmente pura denominada *Papain*, *From Papaya Látex-1,5 units/MG solid (Sigma Aldrich®)*. Esta enzima é uma cisteína protease da família C1-peptidase. Foi utilizada também a *Flavourzyme* que é uma aminopeptidase produzida por fermentação submersa de uma linhagem selecionada do fungo *Aspergillus oryzae*, e utilizadas para hidrólise de proteínas sob condições neutras ou levemente ácidas. A Flavourzyme1000 L[®] é uma exopeptidase com uma atividade de 1000 LAPU/g. Uma LAPU (Unidade Leucina Aminopeptidase) é a quantidade de enzima que

hidrolisa 1 μmol de leucina-*p*-nitroanilida por minuto. A terceira enzima testada foi *Protamex*[®] que é uma enzima proteolítica produzida por fermentação submersa de *Bacillus licheniformes* e *Bacillus amyloliquefaciens* com atividade declarada de 1,5 AU-NH/g. As duas últimas enzimas mencionadas foram fornecidas pela Novozymes Latina Americana Ltda.

Processo de obtenção do hidrolisado proteico

Condições de Hidrólise

Para a realização do processo de hidrólise foram utilizadas 250 g de CMS e 250g de carcaça manualmente desossada (CMD) /g ou mL de enzima e acrescidas de 500 mL de água destilada (1:2) previamente aquecida e colocadas em banho termostaticado (Banho Ultratermostaticado Marconi modelo MA 184). As reações enzimáticas foram conduzidas à temperatura e pH de máxima atividade catalítica de cada enzima de acordo com a literatura e estão descritas na Tabela 1 (OGAWA; MAIA, 1999; CÂNDIDO; SGARBIERI, 2003). O pH das enzimas Flavourzyme e Protamex foram ajustados com solução de fosfato de sódio 0,2 M. Durante a hidrólise as amostras e as enzimas foram continuamente agitadas com agitador mecânico (Agitador Marconi modelo MA 039) durante o tempo de hidrólise (120 minutos). Após a hidrólise da CMS e da CMD, os hidrolisados coletados em tempos de 60 e 120 minutos foram filtrados em uma tela plástica com abertura de malha de 10 mesh, filtrados novamente em uma gaze e depois centrifugados a 4000 rpm, por 10 minutos em uma centrífuga (Cetribio-Servilab) para remover todas as partículas sólidas (fundo) e a gordura (camada superior).

A proteína hidrolisada foi então aquecida a 95°C por 15 minutos para inativar a enzima, em seguida foi esfriada a temperatura ambiente, congelada e então liofilizada a uma temperatura de -54°C em liofilizador (LD 1500 Terroni).

Tabela 1 – Sistemas enzimáticos de hidrólise

Enzimas	[E]:[S] ^a	pH ^b	T°C ^c	Tempo (min.) ^d
Papaína	1:250	6,5	60	120
Flavourzyme	1:250	7,0	50	120
Protamex	1:250	7,0	50	120

^aRelação Enzima/Substrato (p/p); ^bpH ótimo de ação das enzimas; ^cTemperatura ótima de ação das enzimas; ^dTempo total de hidrólise

Fonte: Elaboração dos autores.

Composição proximal dos hidrolisados liofilizados

A composição proximal dos hidrolisados obtidos de diferentes enzimas e matérias-primas foi determinada de acordo com a metodologia recomendada pela AOAC (1995). A quantidade de proteína presente foi determinada pelo método de determinação de nitrogênio total, Kjeldahl ($N \times 6,25$); lipídios pelo método do Bligh & Dyer (1959); cinzas pelo método gravimétrico em mufla (550-600 °C) e o teor de umidade pelo método gravimétrico em estufa (105 °C).

Determinação do Grau de Hidrólise (GH)

Alíquotas de hidrolisados durante os tempos indicados (60 e 120 min.) foram retiradas e a reação foi inativada com adição de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Após repouso de 10 minutos e filtração para a remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA, as proteínas solúveis foram quantificadas pelo método de Lowry et al. (1951), expresso em mg de albumina. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro (Modelo SP-220–Biospectro) a 650 nm. O grau de hidrólise foi medido segundo método descrito por Hoyle e Merrit (1994) e por Liceaga-Gesualdo e Li-Chan, (1999), sendo expresso como percentagem de proteínas solúveis no TCA em relação à quantidade de proteína inicial total, e calculado em mg/g, segundo a Equação 1.

(1)

$$GH = \frac{\text{Proteína Solúvel em TCA 10\%} \times 100}{\text{Proteína Total da Amostra}}$$

Determinação dos minerais

A determinação do conteúdo mineral dos hidrolisados proteicos liofilizados foi realizada através da técnica *Particle-Induced X-ray Emission* (PIXE), segundo a metodologia descrita por Johansson, Campbell e Malmquist (1995).

Por esta técnica analítica multielementar, a composição elementar de certo material pode ser obtida através de raios-x característicos induzidos pela incidência de um feixe de partículas. Neste trabalho, todas as medidas de PIXE foram realizadas no Laboratório de Implantação Iônica (LII) do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os experimentos foram realizados com um feixe de prótons de energia de 2 MeV, proveniente de um acelerador de partículas Tandetron 3MV.

O material liofilizado foi prensado em forma de pellets de aproximadamente 13 mm de diâmetro e 1 cm de espessura. As amostras foram então acomodadas em um suporte metálico dentro da câmara de análises, que é mantida em vácuo da ordem de aproximadamente 10^{-6} mbar. Foram realizadas quatro medidas das amostras de cada grupo (CMD e CMS) estudado neste trabalho, para cada uma das enzimas utilizadas. Cada medida foi realizada durante 400 s com uma corrente média de aproximadamente 3 nA. Os raios-x característicos emitidos foram detectados por um detector de Si(Li) e os espectros de PIXE foram quantificados através do programa GUPIXWIN (Campbell 2000), para obtenção das concentrações elementares. Os resultados são expressos em mg/100g de amostra.

Resultados e discussão

Composição proximal dos hidrolisados liofilizados

A composição proximal dos hidrolisados liofilizados obtidos de diferentes matérias-primas e com diferentes enzimas estão apresentados na Tabela 2.

Os teores de proteínas dos hidrolisados proteicos foram todos superiores aos valores proteicos das matérias-primas de origem (base úmida) (CMS 11,89% e CMD 13,25%). Os teores de proteínas apresentados pelos hidrolisados apresentaram-se dentro dos valores relatados em estudos que indicam como matéria prima cabeças e carne mecanicamente separada de frango (SALES et al.,1991; SURÓWKA; FIK, 1994; SOARES et al., 2000).

Os teores de umidade apresentados pelo hidrolisados liofilizados variaram estatisticamente ($p \leq 0,05$) entre as enzimas e entre as matérias-primas utilizadas. Os teores de umidade estão relacionados às metodologias de secagem e influenciam a vida de prateleira dos mesmos (BUENO-SOLANO et al.,2009).

Os teores de cinzas também variaram estatisticamente ($p \leq 0,05$) entre as enzimas e entre as matérias-primas utilizadas. As elevadas concentrações de cinzas para os hidrolisados obtidos da CMS e CMD com as enzimas Flavourzyme e Protamex, de 10,38% a 12,86%, justificam-se pelo ajuste do pH no início do processo de hidrólise. A elevada concentração de cinzas verificada nos hidrolisados de maria-luiza (*Paralonchurus brasiliensis*) e perna-de-moça (*Cynoscion* sp), de 10,7 a 18,7% , relatados por Neves, Mira e Marquez (2004), é decorrente da formação de NaCl em razão do ajuste do pH durante a hidrólise enzimática das proteínas e também foram encontrados por Liceaga-Gesualdo e Li-Chan (1999), em

hidrolisados protéicos de arenque (21,7%) e em um estudo realizado por Diniz e Martin (1997), com cação (14%).

Os reduzidos teores de lipídios encontrados nos hidrolisados liofilizados, inferiores ao das matérias-primas que lhe deram origem constitui um aspecto favorável em relação à oxidação lípídica e à estabilidade durante o armazenamento (SYNOWIECHI; AL-KHATEEB, 2000). Segundo Nilsang et al. (2005), o processo de centrifugação remove uma grande quantidade dos lipídeos, juntamente com as proteínas insolúveis, o que pode aumentar a estabilidade durante o armazenamento do hidrolisado.

Tabela 2 – Composição proximal dos hidrolisados proteicos de CMS e CMD liofilizados, obtidos através da hidrólise com as enzimas Papaína, Flavourzyme e Protamex.

Enzima	Umidade (%)		Cinzas (%)		Lipídeos (%)		Proteína (%)		Valor CAL (Kcal/100g)	
	CMS	CMD	CMS	CMD	CMS	CMD	CMS	CMD	CMS	CMD
Papaína	4,70 ^{ba} ±0,69	4,58 ^{ca} ±0,15	5,08 ^{ca} ±0,06	4,81 ^{cb} ±0,03	10,34 ^{aa} ±0,77	6,81 ^{ab} ±0,63	77,81 ^{aa} ±1,80	79,36 ^{aa} ±0,32	412,55 ^{aa} ±3,81	396,47 ^{ab} ±2,69
Flavourzyme	8,13 ^{ab} ±0,03	8,51 ^{aa} ±0,24	12,20 ^{ab} ±0,16	12,86 ^{aa} ±0,06	8,45 ^{ba} ±0,55	5,45 ^{ab} ±0,47	70,20 ^{ba} ±1,01	67,86 ^{bb} ±0,66	360,93 ^{ca} ±3,24	341,79 ^{bb} ±2,44
Protamex	3,58 ^{cb} ±0,04	6,23 ^{ba} ±0,31	10,38 ^{bb} ±0,03	11,07 ^{ba} ±0,09	7,28 ^{ba} ±0,26	3,27 ^{bb} ±0,97	78,55 ^{aa} ±0,15	68,21 ^{bb} ±0,62	380,53 ^{ba} ±1,18	347,12 ^{bb} ±3,42

Médias dentro da mesma coluna com letras minúsculas, e da mesma linha com letras maiúsculas com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Fonte: Adaptado de Oliveira et al., 2013.

Grau de Hidrólise

Os resultados do grau de hidrólise da CMS e CMD, com as diferentes enzimas estão apresentados na Figura 1.

O processo de hidrólise enzimática da proteína resulta invariavelmente na diminuição do peso molecular, no aumento do número de grupos ionizáveis e também na exposição de grupos hidrofóbicos que estavam protegidos na estrutura original da proteína (PANYAM e KILARA, 1996).

O grau de hidrólise proporcionado pelas enzimas aumentou com o aumento do tempo de reação de hidrólise. Durante os primeiros 60 minutos de hidrólise para a CMS somente o grau de hidrólise da enzima Flavourzyme foi estatisticamente menor ($p \leq 0,05$) quando comparado com as outras enzimas. Porém, para a CMD as três enzimas utilizadas

apresentaram valores para o grau de hidrólise significativamente diferente nos dois tempos de hidrólise ($p \leq 0,05$).

Entre a CMS e a CMD aos 60 e aos 120 minutos os valores para o grau de hidrólise variaram significativamente ($p \leq 0,05$), ou seja, para as três enzimas o grau de hidrólise sempre foi maior para a CMS, quando comparado com a CMD.

Inúmeras variáveis podem influenciar o grau de hidrólise, como por exemplo, o pH, a temperatura, a classificação das enzimas que variam o seu modo de ação catalítica (endo ou exo atividade), ou ainda a forma de ligação como seu sítio ativo (BENÍTEZ; IBARZ; PAGAN, 2008).

A Flavourzyme é uma exopeptidase, ou seja, ela cliva os aminoácidos terminais das proteínas ou peptídeos e isto talvez justifique a sua menor eficiência neste estudo. Porém, o uso de Flavourzyme proporciona a produção de hidrolisados de proteína sem o sabor amargo característico da maioria dos hidrolisados proteicos (YUST et al, 2007). Segundo Nilsang et al., (2005) existe uma preferência pela utilização de endoproteinases, na produção de hidrolisados proteicos.

O menor grau de hidrólise para a CMD com todas as enzimas utilizadas pode estar relacionado com a quantidade de lipídeos apresentada por esta matéria-prima oriunda da desossa manual, já que durante o experimento optou-se por utilizar a carcaça por inteiro sem a retirada da pele e o teor de lipídeos desta matéria-prima apresentou 26,79%.

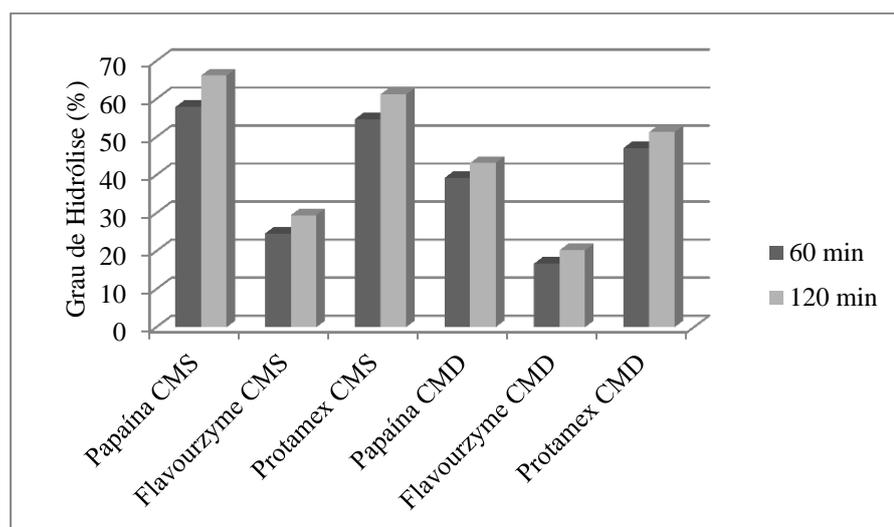


Figura 1 – Grau de hidrólise para CMS e CMD durante os tempos de 60 e 120 minutos de hidrólise para as diferentes enzimas utilizadas em condições estabelecidas de pH e temperatura.

Determinação dos minerais

As Tabelas 3 e 4 apresentam os valores de minerais dos hidrolisados liofilizados obtidos através da hidrólise enzimática da CMS e da CMD, respectivamente.

O teor de sódio foi estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$) para as três enzimas, tanto na CMS quanto na CMD, mas a Protamex e a Flavourzyme apresentaram os maiores valores, provavelmente devido ao fato que para os experimentos com estas enzimas ocorreu o ajustamento do pH com fosfato de sódio 0,2 M.. Além disto, a Protamex utiliza como estabilizante cloreto de sódio (NOVOZYMES, 2009).

As quantidades de fósforo variaram estatisticamente para a CMS e a CMD ($p \leq 0,05$) entre a Papaína e a Flavourzyme e Protamex, igualmente pelo ajuste de pH necessário para a Flavourzyme e a Protamex. Os valores encontrados neste estudo são superiores aos relatados por Pinto e Silva et al., (2008) que encontraram 125,00 mg/100g de fósforo em carne de frango hidrolisada por bromelina oriunda do suco de abacaxi. Segundo a Tabela TACO, (2011). Os valores de fósforo para frango inteiro, com pele cru é de 174 mg/100g, portanto neste estudo a hidrólise aumentou este valor independentemente do ajuste do pH.

Os teores de cálcio encontrados foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) para as três enzimas estudadas na CMS, enquanto que na CMD somente a Papaína foi significativamente diferente. Os liofilizados obtidos com a Papaína apresentaram os maiores valores para cálcio (128,00 mg/100g/CMS;127,25 mg/100g/CMD), valores inferiores ao relatado por Fonkwe e Singh (1996), de 212,10 mg/100g de cálcio, obtido de hidrolisado de carne mecanicamente separada de peru com a utilização da enzima papaína. Pinto e Silva et al.,(2008), trabalhando com hidrolisados de carne de peru,frango e bovina obtidos com o suco de abacaxi (bromelina), encontraram valores de 10,30;7,50 e 8,20 mg/100g respectivamente de cálcio.

Naturalmente a CMS é uma matéria-prima que possui um percentual elevado de cálcio devido ao seu processo tecnológico de obtenção. Sabe-se que alguns grupos de compostos podem melhorar a atividade das enzimas. Os íons metálicos são exemplos, que tanto podem atuar livres na solução ou com o substrato ou ainda, fortemente ligados à enzima, participando da catálise de muitas formas (LEHNINGER, 2002). De acordo com Kaul et. al. (2002), os cátions cálcio (Ca^{2+}) são capazes de aumentar a atividade da papaína pura em até 18%, isso porque sua presença afeta a estrutura secundária da enzima, ou seja, são capazes de auxiliar na formação de ligações químicas, ou ainda, de fortalecer a interação de vários domínios da proteína.

Vários estudos têm relatado que durante a hidrólise de inúmeros substratos com diferentes enzimas tem-se produzido peptídeos bioativos queladores de cálcio, elevando o percentual deste mineral nos hidrolisados. Diversas fontes de peptídeos de ligação de cálcio são citadas como as que incluem o músculo de carpas (COFFEE; BRADSHAW,1973), casca de ovo de galinha (DAENGPORK, 2003), leite (MINE; SHAHIDI, 2006), escamudo do Alasca (peixe branco) (JUNG et al.,2006), peixe hoki (JUNG; KIM, 2007), proteína de soja (BAO et al., 2007), proteína de plasma de sangue suíno (LEE ; SONG, 2009b), camarão (HUANG; REN; JIANG, 2011) e tilápia (CHAROENPHUN et al.2013). Possivelmente durante a hidrólise com a papaína sejam gerados peptídeos com a função de quelar o cálcio tornado suas concentrações mais significativas nos hidrolisados, tanto de CMS como de CMD.

Tabela 3- Resultados dos minerais presentes nos hidrolisados proteicos liofilizados de carne mecanicamente separada (CMS) de frango obtido por hidrólise enzimática com Papaína, Flavourzyme e Protamex.

Elementos/Minerais	CMS/Papaína mg/100g	CMS/Flavourzyme mg/100g	CMS/Protamex mg/100g	RDA* (mg/dia)
Na	368,06 ^c ±83,84	2, 251.08 ^b ±162,66	4, 201.16 ^a ±1,358.89	500-2.400
Mg	100,70 ^a ±92,32	88,35 ^a ±6,27	69,75 ^a ±7,11	350/280
Al	10,16 ^a ±5,28	13,73 ^a ±5,65	7,56 ^a ±4,79	-
Si	25,53 ^a ±18,73	13,18 ^a ±1,75	11,36 ^a ±5,28	-
P	798,54 ^b ±72,85	2, 067.62 ^a ±188,52	2, 499.38 ^a ±754,11	1.200
S	650,52 ^a ±35,41	452,88 ^b ±24,38	421,34 ^b ±59,41	-
Cl	470,3 ^c ±21,16	836,96 ^b ±89,64	1, 864.56 ^a ±68,18	-
K	1, 408.98 ^b ±67,39	2, 098.6 ^a ±227,19	1, 350.74 ^b ±66,50	2.000-3.500
Ca	128,00 ^a ±11,56	68,11 ^b ±11,00	44,17 ^c ±11,91	1.200
Fe	196,00 ^a ±427,31	4,21 ^a ±0,69	3,76 ^a ±1,10	12/15
Zn	114,45 ^a ±245,88	3,93 ^a ±0,38	4,32 ^a ±0,43	15/12
Rb	5,75 ^a ±2,28	8,63 ^a ±2,64	8,04 ^a ±3,39	-

Médias dentro da mesma linha, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey.

*RDA - *Recommended Dietary Allowances* (1989)

Fonte: Elaboração dos autores.

Na nutrição humana a absorção do fósforo está intimamente relacionada com a quantidade de cálcio disponível. Segundo Willians (1997), os fatores que favorecem ou dificultam a absorção do fósforo são praticamente os mesmos do cálcio. Para ajudar a manter o equilíbrio normal sérico cálcio-fósforo, suas quantidades na dieta devem ser equilibradas em 1:1. Entretanto, suplementos de cálcio ou mesmo elevadas ingestões de cálcio podem comprometer este equilíbrio e alterar a absorção do fósforo. Neste caso, os hidrolisados poderão entrar como parte de uma formulação para fins especiais.

Os níveis aumentados de cloro e de potássio ($p \leq 0,05$) para os hidrolisados obtidos com a Flavourzyme e Protamex, tanto na CMS quanto na CMD, são explicados pela utilização de cloreto de potássio e cloreto de sódio, respectivamente, como estabilizantes para as enzimas (NOVOZYMES, 2009).

Os valores de RDA (*Recommended Dietary Allowances*), apresentados na Tabela 3 e 4, são para adultos jovens, masculinos e femininos, na faixa etária de 19 a 24 anos. Para o potássio e o sódio, são dadas faixas de valores, representando mínimos e máximos recomendados. Para magnésio, ferro e zinco, os valores são dados em duplicata separados por barra, sendo que o primeiro valor aplica-se ao gênero masculino e o segundo ao gênero feminino (RDA, 1989).

Comparando a riqueza mineral dos hidrolisados obtidos com a CMS a RDA, pode-se concluir que 100g dos hidrolisados (média das três enzimas) poderiam fornecer, desde um mínimo de 6,72% para o Ca e um máximo de 100% da RDA para o sódio.

O ferro não variou significativamente ($p \leq 0,05$) entre os hidrolisados proteicos provenientes da CMS e da CMD. Os teores apresentados (Tabela 3 e 4) foram maiores que os encontrados por Pinto e Silva et al., (2008), em hidrolisados de peru, frango e carne bovina (0,43; 0,36 e 1,50mg/100g) valores diferenciados pela concentração de mioglobina que é variável entre as espécies, além das quantidades de ferro heme e não heme (PURCHAS et al., 2003). Fonkwe e Singh (1996), relataram 7,2 mg/100g de hidrolisado obtido de resíduo de carne mecanicamente separada de peru utilizando a papaína com enzima proteolítica. Bueno-Solano et al., (2009) relataram 12,43 mg/100g de ferro em um hidrolisado proteicos de resíduos de camarão fermentados.

O ferro participa de muitos processos bioquímicos, incluindo reações de transferência de elétrons, regulação gênica, ligação e transporte de oxigênio, crescimento e diferenciação celular, por isto é um elemento essencial para a nutrição humana. Sua deficiência pode ocasionar doenças, tais como anemia, glossite, estomatite angular, problemas nas unhas, esclera azulada e problemas esofágicos (BEARD, 2001).

O ferro pode gerar espécies reativas de oxigênio e estar relacionado a doenças cardiovasculares e neurológicas, tais como a aterosclerose, doença de Alzheimer e de Parkinson (BLAT et al., 2008). Além disso, estas espécies reativas de oxigênio podem ter um impacto negativo sobre o sabor, textura, e valor nutritivo vida de prateleira de produtos alimentares (CHUNG et al., 2002).

Segundo Swain, Tabatabai, e Reddy, (2002), alguns compostos alimentares, tais como componentes redutores, ácidos esteáricos, determinados aminoácidos ácidos (His, Glu, Asp e

Cis) e peptídeos liberados durante a hidrólise protéica podem melhorar a absorção do ferro. Estes compostos podem se ligar ao ferro, formando complexos solúveis e melhorar a biodisponibilidade de ferro (STORCKSDIECK, BONSMANN, HURREL, 2007). O ferro na CMS pode estar aumentado já que o principio de obtenção desta matéria-prima através da separação mecânica libera grandes quantidades de lipídeos e hemoglobina da medula óssea (McMINDES; SIEDLER, 1988).

Os teores de zinco não variaram significativamente ($p \leq 0,05$) entre as enzimas para a CMS, já para a CMD a Papaína e a Flavourzyme deferiram significativamente ($p \leq 0,05$). Os valores apresentados nas Tabelas 3 e 4, para este elemento são bem superiores aos relatados por Fonkwe e Singh (1996), que encontraram 1,4mg/100g de hidrolisado de resíduo de carne mecanicamente separada de peru . O zinco tem-se mostrado como um importante componente funcional, pois está presente em várias enzimas distribuídas pelo corpo e que participam de diversos processos metabólicos, como crescimento e multiplicação celular, cicatrização e funcionamento dos macrófagos e linfócitos relacionados ao bom funcionamento do sistema imunológico, sendo importante também para manter o equilíbrio ácido-base no organismo e manter em ordem as percepções de sabor e odor (WAITZBERG, 2000; MAFRA e COZZOLINO, 2004; PERES e KOURI, 2006; SAZAWAL et al., 2007).

Além disso, a deficiência de zinco pode provocar problemas de crescimento, perda de cabelo, diarreia, impotência sexual, depressão, lesões oculares e de pele e perda de peso. Para uma alimentação rica em zinco, devem ser consumidas carnes vermelhas, aves, germe de trigo, semente de abóbora, ovo, mostarda em pó e nozes (MEDEIROS, 2012).

Bueno-Solano et al., (2009), analisaram hidrolisados proteicos de resíduos de camarão fermentados e obtiveram 7,83 mg/100g de zinco.

Tabela 4- Resultados dos minerais presentes nos hidrolisados proteicos liofilizados de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango, obtidos por hidrólise enzimática com Papaína, Flavourzyme e Protamex.

Elementos/Minerais mg/100g	CMD/Papaína	CMD/Flavourzyme	CMD/Protamex	RDA* (mg/dia)
Na	420,70 ^b ±22,63	2,484. 22 ^a ±626, 83	2,644. 37 ^a ±440, 22	500-2.400
Mg	81,49 ^a ±5,96	82,28 ^a ±11,26	73,42 ^a ±23,10	350/280
Al	4,46 ^a ±1,32	16,41 ^a ±13,24	7,85 ^a ±5,33	-
Si	19,66 ^a ±18,61	57,23 ^a ±72,19	16,43 ^a ±8,51	-
P	579,82 ^b ±13,71	2,097.37 ^a ±517,61	1,546.25 ^a ±205,87	1.200
S	713,75 ^a ±8,18	664,40 ^a ±142,88	664,95 ^a ±134,64	-
Cl	504,45 ^c ±14,46	1,449.67 ^b ±341,42	2,584.5 ^a ±394,54	-
K	1,489.37 ^b ±29,88	3,325.17 ^a ±759,07	1,874.72 ^b ±324,20	2.000-3.500
Ca	127,25 ^a ±6,53	62,65 ^b ±10,31	56,33 ^b ±14,27	1.200
Fe	3,79 ^a ±0,27	9,68 ^a ±5,86	5,14 ^a ±1,21	12/15
Zn	2,74 ^b ±0,22	4,51 ^a ±1,40	3,124 ^{ab} ±0,24	15/12
Rb	7,17 ^b ±1,83	20,13 ^a ±3,67	10,85 ^b ±5,98	-

Médias dentro da mesma linha, com letras diferentes são significativamente diferentes, no nível de 5%, pelo teste de Tukey.

*RDA - *Recommended Dietary Allowances* (1989)

Fonte: Elaboração dos autores.

Nas Tabelas 3 e 4, também pode ser visualizados os teores de magnésio, que não variaram significativamente ($p \leq 0,05$) entre as enzimas para as duas matérias-primas analisadas (CMS e CMD), e estes foram superiores aos relatados por Fonkwe e Singh (1996), que encontraram 67,3mg/100g de magnésio em um hidrolisado obtido a partir de resíduo de carne mecanicamente separada de peru. Magnésio é um elemento essencial, que exerce papel essencial nas atividades enzimáticas, atuando como cofator em mais de 300 reações metabólicas, como no metabolismo energético e proteico, glicólise e síntese de adenosina trifosfato (ATP) (BUENO, 2008).

Comparando a riqueza mineral dos hidrolisados obtidos com a CMD a RDA, pode-se concluir que 100g dos hidrolisados (média das três enzimas) poderiam fornecer, desde um mínimo de 6,80% para o Ca, até ultrapassar a RDA recomendada para o fósforo de 117%.

Conclusões

Os hidrolisados proteicos liofilizados obtidos a partir da CMS e da CMD possuem minerais importantes para a manutenção da saúde.

Os hidrolisados liofilizados produzidos com a Papaína apresentaram os maiores valores de cálcio, pois o mesmo aumenta em 18% a atividade desta enzima.

Os hidrolisados proteicos oriundos da CMD e da CMS obtidos com a Protamex e a Flavourzyme ultrapassam a RDA para o fósforo e sódio.

Os níveis aumentados de cloro e potássio para os hidrolisados obtidos com a Flavourzyme e Protamex , tanto na CMS quanto na CMD, são devidos a utilização de cloreto de potássio e cloreto de sódio, respectivamente como estabilizantes para as enzimas.

Referências

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 16th ed. Horowitz: Washington D.C., 1995.

BAO, X. L.; SONG, M.; ZHANG, J.; CHEN, Y.; GUO, S. T. Calcium-binding ability of soy protein hydrolysates. **Chin Chem Lett**, n. 18, pp. 1115–1118, 2007.

BEARD, J. L. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. **The Journal of Nutrition**, n. 131, pp. 568S–580S, 2001.

BENÍTEZ, R.; IBARZ, A.; PAGAN, J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones, **Acta Bioquím Clín Latinoam**, v. 42, n. 2, pp. 227-36; 2008.

BLAT, D.; WEINER, L.; YODIM, M. B. H.; FRIDKIN, M. A novel iron-chelating derivate of the neuroprotective peptide NAPVSIPQ shows superior antioxidant and antineurodegenerative capabilities. **Journal of Medicinal Chemistry**, n. 51, pp. 126–134, 2008.

BOUHALLAB, S.; CINGA, V.; AÏT-OUKHATAR, N.; BUREAU, F.; NEUVILLE, D.; ARHAN, P.; MAUBOIS, J.L.; BOUGLÉ, D.. Influence of various phosphopeptides of caseins on iron absorption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 50, pp. 7127–7130, 2002.

BUENO L. Effect of medium-chain triglycerides, fiber and calcium on the availability of magnesium and zinc by an in vitro method and response surface methodology. **Quim Nova**, n. 31, pp. 306-11, 2008.

BUENO-SOLANO, C.; LOPEZ-CERVANTES, J.; CAMPAS-BAYPOLI, O. N.; LAUTERIO-GARCIA, R.; ADAN-BANTE, N. P.; SANCHEZ-MACHADO, D. I. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. **Food Chemistry**, n. 112, pp. 671–675, 2009.

CAMPBELL, J.L.; HOPMAN, T.L.; MAXWELL, J.A.; NEJEDLY, Z. The Guelph PIXE software package III: alternative proton database. **Nucl Instr Meth Phys Res B**, v. 170, n. 2000, pp. 193–204.

CÂNDIDO, L.M.B.; SGARBIERI, V.C. A hidrólise enzimática de tilápia do Nilo (*Oreochromus niloticus*) proteínas miofibrilares: efeitos sobre propriedades nutricionais e hidrofílico. **J. Sci. Food Agric.**, n. 83, pp. 937-944, 2003.

CHAROENPHUN, N.; CHEIRSILP, B.; SIRINUPONG, N.; YOURAVONG, W. Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. **Eur Food Res Technol.**, Germany, v. 236, n.1, p. 57-63, 2013.

CHUNG, Y. C.; CHANG, C. T.; CHAO, W. W.; CHING-FWU, L.; SU-TZE, C. Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK 1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, pp. 2454–2458, 2002.

COFFEE, C.J.; BRADSHAW, R.A. Carp muscle calcium-binding protein I. characterization of the tryptic peptides and the complete amino acid sequence of component B. **J Biol Chem**, n. 248, pp. 3305-3312, 1973.

CROSS, K. J.; HUQ, N. L.; REYNOLDS, E. C. Casein Phosphopeptides. **Oral Health Chemistry and Clinical Applications Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 8, pp. 793-800, 2007.

DAENGPROK, W.; GARNJANAGOONCHORN, W.; NAIVIKUL, O.; PORNINLPATIP, P.; SIGONIS, K.; MINE, Y. Chicken eggshell matrix proteins enhance calcium transport in the human intestinal epithelial cells, Caco-2. **J Agric Food Chem**, n. 51, pp. 6056–6061, 2003.

DINIZ, F.M.; MARTIN, A.M. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein. Composition of the hydrolysates. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v.48, p.191-200, 1997.

FONKWE, L. G.; SINGH, R. K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. **Process Biochemistry**, Watford, v. 31, n. 6, p. 605-616, 1996.

GOBBETTI, M.; STEPANIAK, L.; DE ANGELIS, M.; CORSETTI, A.; DI CAGNO, R. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n. 42, pp. 223–239, 2002.

HOYLE, N. T.; MERRIT, J. H. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, n. 1, p. 76-79, 1994.

HUANG, G.; REN, L.; JIANG, J. Purification of a histidine-containing peptide with calcium binding activity from shrimp processing byproducts hydrolysate. **Eur Food Res Tech**, n. 232, pp. 281–287, 2011.

JOHANSSON, A. E.; CAMPBELL, J. L.; MALMQUIST K. G. Particle **Induced X-Ray emission spectroscopy (PIXE)**: Wiley, 1995.

JUNG, W. K.; KARAWITA, R.; HEO, S. J.; LEE, B. J.; KIM, SK.; JEON, Y. J. Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis. **Process Biochem**, n. 41, pp. 2097–2100, 2006.

JUNG, W. K.; KIM, S. K. Calcium-binding peptide derived from pepsinolytic hydrolysates of hoki (*Johnius belengerii*) frame. **Eur Food Res Tech**, n. 224, pp. 763–767, 2007.

KAUL, P.; SATHISH, H. A.; PRAKASH, V. Effect of metal ions on structure and activity of papain from *Carica papaya*. **Nahrung/Food**, v. 46, n. 1, p. 2-6, 2002.

KIM, S. B.; SEO, I. S.; KHAN, M. A.; KI, K. S.; NAM, M. S.; KIM, H. S. Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. **International Dairy Journal**, 17, 625–631, 2007.

LEE, S. H.; SONG, K. B. Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein. **Process Biochemistry**, n. 44, p. 378–381, 2009a.

LEE, S.H.; SONG, K.B. Isolation of a calcium-binding peptide from enzymatic hydrolyzates of porcine blood plasma protein. **J Appl Biol Chem (Korean Soc Appl Biol Chem)**, n. 52: pp. 290–294, 2009b.

LEHNINGER, A. L. Enzymes; “principles of biochemistry”. São Paulo: Savier, 2002. p. 190-237.

LICEAGA-GESUALDO, A. M.; LI-CHAN, E. C. Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*clupea harengus*). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, n. 6, p. 1000-1004, 1999.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin Fhenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.

LV, Y.; LIU, Q.; BAO, X. L.; TANG, W. X.; YANG, B. C.; GUO, S. T. Identification and characteristics of iron-chelating peptides from soybean protein hydrolysates using IMAC-Fe³⁺. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 57, pp. 4593–4597, 2009.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S.M. The importance of zinc in human nutrition. **Rev Nutr Campinas**, n. 17, pp. 79-87, 2004.

McMINDES, M. K.; SIEDLER, A. J. Nitrite mode of action: inhibition of yeast pyruvate decarboxylase (E.C. 4.1.1.1) and clostridial pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (E.C. 1.2.7.1) by nitric oxide. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 53, n. 3, p. 917-919-931, 1988.

MEDEIROS, M. A. Zinco. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 3, p. 159-160, ago. 2012.

MEGÍAS, C.; PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F. et al. Affinity purification of copper chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 55, pp. 3349–3954, 2007.

MEGÍAS, C.; PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F. et al. Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. **LWT – Food Science and Technology**, n. 41, pp. 1973–1977, 2008.

MINE, Y.; SHAHIDI, F. **Nutraceutical proteins and peptides in health and disease**. New York: CRP press, 2006.

MIQUEL, E.; FARRE, R. Effects and future trends of casein phosphopeptides on zinc bioavailability. **Trends in Food Science and Technology**, n. 18, pp. 139–143, 2007.

NEGRÃO, C. C.; MIZUBUTI, I. Y.; MORITA, M. C.; COLLI, C.; IDA, E. I.; SHIMOKOMAKI, M. Biological evaluation of mechanically deboned chicken meat protein quality. **Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 579-583, 2005.

NEVES, R. A. M.; MIRA, N. V. M.; MARQUEZ, U. M. L. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 101-108, 2004.

NILSANG, S.; LERTSIRI, S.; SUPHANTHARIA, M.; ASSAVANIG, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. **Journal of Food Engineering**, Westport, v. 70, n.4, p. 571-578, 2005.

NOVOZYMES. **Rethink Tomorrow**: ficha de informações de produtos e dados de segurança. Disponível em: <<http://www.novozymes.com>>. Acesso em: 15 out.2009.

OGAWA, N. B. P.; MAIA, E. L. **Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Varela, 1999. 430 p.

PANYAM, D.; KILARA, A. Enchanting the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.7, n.4, p.120-125,1996.

PERES, P.M.; KOURY, J.C. Zinco, imunidade, nutrição e exercício. **CERES**; n. 1, pp. 9-18, 2006.

PINTO E SILVA, M.E.M.; PATON,I.; TRIGO,M.; VON ATZINGEN, M.C.B. C.; KIRA,C.S.; INOMATA,E.I.; LAMARDO,L.C.A. Mineral and vitamin content of beef, chicken, and turkey hydrolysates- Mineral and vitamin content of protein hydrolysates, **Quim. Nova**, v. 31, no. 1, 41-43, 2008.

PURCHAS, R. W.; SIMCOCK, D. C.; KNIGHT, T. W.; WILKINSON, B. H. P.; Variation in the form of iron in beef and lamb meat and losses of iron during cooking and storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 38, n. 827–837, 2003.

RDA. **Recommended Dietary Allowances**. 10th. ed. Washington: National Research Council, National Academy Press,1989. 284p.

SALES, A. M.; CARVALHO, A. C. V.; BALDINI, V. L. S.; GONÇALVES, J. R.; BERAQUET, J. N. Extração enzimática de proteína de resíduo de carne de frango mecanicamente separada. **Coletânea Ital**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 223-242, 1991.

SAZAWAL S.; BLACK R. E.; RAMSAN, M.; CHWAYA, H. M.; DUTTA, A.; DHINGRA, U et al. Effect of zinc supplementation on mortality in children aged 1-48 months: a community-based randomised placebo controlled. **Trial Lancet**, n. 369, pp. 927-34, 2007.

- SCHMIDL, M.K.; TAYLOR, S.L.; NORDLEE, J.A. Use of hydrolysate-based products in special medical diets. **Food Technol.**, v.48, n.10, p.77–85, 1994.
- SOARES, L. H. B.; MARQUES, D. N.; ALBUQUERQUE, P. M.; AYUB, M. A. Z. Influence of some commercial proteases and enzymatic associations on the hydrolytic solubilization of deboned poultry meat proteins. **Food Science and Technology International**, London, v. 6, n. 4, p. 301-306, 2000.
- STORCKSDIECK, S., BONSMANN, G., & HURREL, R. F. Iron-binding properties, amino acid composition, and structure of muscle tissue peptides from in vitro digestion of different meat sources. **Journal of Food Science**, 72, S19–29, 2007.
- SURÓWKA, K.; FIK, M. Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. I. Application of pepsin to the production of protein hydrolysate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 65, n. 3, p. 289-296, 1994.
- SWAIN, J. H.; TABATABAI, L. B.; REDDY, M. B. Histidine content of lowmolecular-weight beef proteins influences nonheme iron bioavailability in Caco-2 cells. **The Journal of Nutrition**, n. 132, pp. 245–251, 2002.
- SYNOWIECHI, J.; AL-KHATEEB, N.A.A.Q. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. **Food Chem.**, v.68, p.147-152, 2000.
- TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (TACO), NEPA–UNICAMP. 4. ed. rev. e ampl. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011.161p.
- TORRES-FUENTES, C.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J. Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides, **Food Chemistry**, n. 134, pp. 1585–1588, 2012.
- UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). Relatório anual: 2012.** São Paulo: UBABEF, 2012.
- VIOQUE, J.; SÁNCHEZ-VIOQUE, R., CLEMENTE, A., PEDROCHE, J., YUST, M. M.; MILLÁN, F. Péptidos bioactivos en proteínas de reserva. **Grasas y Aceites**, n. 51, pp. 361–365, 2000.
- WAITZBERG, D.L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica.** 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. v. 1.
- WILLIAMS, S.R. **Fundamentos de nutrição e dietoterapia.** Porto Alegre: Artmed Editora; 1997. 668p.
- YUST, M.D.M.; PEDROCHE, J.; ALAIZ, M. N-CALLE, J.G.; VIOQUE, J. MATEO, C.S.; GUIAÑÁN, J.M.; MILLÁN, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Partial Purification and Immobilization/Stabilization on Highly Activated Glyoxyl-agarose Supports of Different Proteases from Flavourzyme. **J. Agric. Food Chem.** 55, 65036508, 2007.

5 DISCUSSÃO

A utilização dos hidrolisados proteicos na formulação de dietas especiais vem ganhando muito destaque nos últimos anos. Os hidrolisados podem ser definidos como proteínas cindidas química ou enzimaticamente, que produzem peptídeos de diferentes tamanhos. Especialmente, os hidrolisados enzimáticos de proteínas, podem ser utilizados com fins terapêuticos para a melhoria ou a manutenção do estado nutricional de pacientes com restrições proteicas ou de aminoácidos em sua dieta. Desta forma, muitas fontes proteicas estão sendo estudadas e utilizadas com este propósito, em formulações específicas como suplementos para idosos e desportistas, dietas para controle de peso, ou ainda de uso terapêutico (alergias, gastroenterite, diarreia, síndromes de má-absorção e fenilcetonúria) ou ainda em dietas entéricas (CLEMENTE, 2000; MIRA, MARQUEZ, 2000; AKYIAMA et al., 2006; BENITEZ; IBARZ; PAGAN, 2008).

Além disto, observa-se um crescente interesse tecnológico dos hidrolisados enzimáticos proteicos, uma vez que a hidrólise enzimática pode contribuir para a melhoria das propriedades funcionais das proteínas, ampliando desta forma a sua utilização pela indústria alimentícia (SGARBIERI, 1996; KRISTINSSON & RASCO, 2000a).

Recentemente a descoberta de inúmeras propriedades bioativas dos hidrolisados proteicos, ou dos peptídeos gerados durante o processo de hidrólise aumentou ainda mais, o interesse de pesquisadores. Propriedades antioxidantes (milho, soja, canola, badejo, e o colágeno suíno) anti-hipertensivas (caseína, soro de leite, soja, pescados, hemoglobina suína, carne bovina, suína e de frangos), imunomodulatória (peixes), anticancerígena (casca de camarão) e ação anticolesterolêmica (salmão, sardinha) têm sido relatadas (SHAHIDI ;ZHONG, 2008; SAITO et al., 2009; AHHMED; MUGURUMA, 2010; KANNAN et al., 2011; NESSE et al., 2011; KHALED et al. 2011).

Raros são os estudos que utilizam como fonte de matéria-prima para a obtenção dos hidrolisados, a carne de frango, ou a carne mecanicamente separada (CMS) ou ainda as carcaças manualmente desossadas (CMD) de frango, porém a obtenção de hidrolisados proteicos de carne de frango pode representar uma alternativa para o setor avícola, como uma alternativa, ou uma estratégia de

diferenciação dos produtos avícolas. A baixa rentabilidade dos produtos *in natura* estimula o destaque aos produtos de maior valor agregado, buscando maior rentabilidade e, desta forma uma proteção contra as oscilações no mercado de *commodities* (BARBUT, 2002).

Estudos comprovaram que as proteases produzem melhores resultados retendo o valor nutricional dos alimentos, porém a qualidade do produto varia com a natureza da enzima e as condições de processamento (SIMPSON et al.,1998).

As enzimas proteolíticas representam um grupo muito importante de enzimas industriais com uma ampla faixa de aplicações biotecnológicas bem definidas dentro da indústria, como a produção de alimentos, fabricação de detergentes, indústria têxtil, de couros, indústria de medicamentos e cosméticos, nas análises clínicas e na produção de hidrolisados proteicos (MUSSATTO, FERNANDES, MILAGRES, 2007).

As enzimas proteolíticas classificam-se em endoproteases ou endopeptidases, as quais hidrolisam ligações peptídicas interiores a cadeia polipeptídica em ligações suscetíveis distribuídas ao longo da cadeia, enquanto as exoproteases removem aminoácidos N ou C terminais também pela hidrólise de ligações peptídicas (CLEMENTE, 2000).

As enzimas comerciais utilizadas neste estudo foram a Papaína[®], de origem vegetal obtida do mamão, a Flavourzyme[®] que é uma aminopeptidase produzida por fermentação submersa de uma linhagem selecionada do fungo *Aspergillus oryzae* e a Protamex[®] produzida por fermentação submersa de *Bacillus licheniformes* e *Bacillus amyloliquefaciens* (EVANGELISTA, 2000; KRISTISSON; RASCO, 2000b; SLIZYTE et al.,2004).

As matérias primas (CMS e CMD) utilizadas para a realização do processo de hidrólise com as enzimas proteolíticas possuem composições proximais diferenciadas, principalmente no que diz respeito à concentração de proteínas e de lipídeos. A CMS apresentou um teor médio de proteínas de 11,89% e a CMD 13,25%. A maior diferença ocorreu em relação aos lipídeos, a CMS apresentou 18,36% e a CMD 26,79%, devido ao fato de que na CMD foi retirada a pele, ou seja, a carcaça foi totalmente utilizada.

Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos-TACO (2011), os valores encontrados para a CMD foram diferentes dos valores encontrados para a amostra de frango inteiro, com pele e cru, cujos valores são de 66,5% de umidade, 16,4% de proteína, 17,3% de lipídeos e 0,7% de cinzas.

Gonçalves et al., (2009), analisaram 20 amostras de CMS de frango e encontraram valores médios de 16% de proteína, 17% de lipídeos, 61% de umidade e 1,17 de cinzas. Os limites oficiais sobre a qualidade físico-química da CMS são descritos no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Aves, Bovinos e Suínos anexo à Instrução Normativa nº4 (BRASIL, 2000), o qual estabelece alguns dos parâmetros de qualidade como 30% de lipídios totais no máximo e de 12% de proteínas no mínimo.

Os tempos de hidrólise, a concentração de enzima e de substrato neste experimento foram iguais para as duas matérias-primas e todas as enzimas utilizadas, porém a temperatura e o pH foram ajustados de acordo com as características das enzimas (OGAWA; MAIA, 1999; CÂNDIDO; SGARBIERI, 2003).

O grau de hidrólise é uma medida da extensão da degradação hidrolítica da proteína. É considerado o mais prático e conveniente meio para controlar o processo de hidrólise. O grau de hidrólise é amplamente utilizado como parâmetro para avaliar e comparar os diferentes hidrolisados de proteínas, sendo o principal determinante das propriedades do hidrolisado de proteína (NEVES et al., 2004).

O grau de hidrólise proporcionado pelas enzimas aumentou com o aumento do tempo de reação de hidrólise. Durante os primeiros 60 minutos de hidrólise para a CMS somente o grau de hidrólise com a enzima Flavourzyme foi estatisticamente menor ($p \leq 0,05$) quando comparado com as outras enzimas. Porém, para a CMD as três enzimas utilizadas apresentaram graus de hidrólise significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) nos dois tempos de hidrólise.

O grau de hidrólise encontrado para a Flavourzyme assemelha-se ao encontrado por Santos (2006), em um estudo com esta enzima, na elaboração de hidrolisado de Cabrinha (*Prionotus punctatus*) nas mesmas condições reacionais utilizadas neste trabalho, cujo grau de hidrólise encontrado foi de 24,7%.

Herpandi et al.,(2012) no processo de hidrólise de atum (*Katsuwonus pelamis*) com várias enzimas proteolíticas sugeriram que o grau de hidrólise aumentou linearmente com o tempo e concentração de enzima. Esses autores também concluíram que a Alcalase[®] 2.4L FG apresentou o maior o maior grau de hidrólise entre todas as proteases utilizadas seguido de Protamex[®], Flavourzyme 500MG[®] e Neutrase[®] 1,5 mg.

A CMD exibiu menores valores de grau de hidrólise quando comparada com a CMS e isto pode estar relacionado com o percentual de lipídeos demonstrado por esta matéria-prima oriunda da desossa manual, que apresentou um teor médio de 26,79% de lipídeos, enquanto que a CMS apresentou 18,36% de lipídeos. O percentual aumentado de lipídeos na matéria-prima pode comprometer os resultados de hidrólise, pois segundo Slyztye et al., (2005), podem ocorrer inúmeros problemas como por exemplo, a formação de complexos proteína/lipídeos aparentemente mais resistentes ao processo de hidrólise enzimática.

A papaína apresentou o maior grau de hidrólise para matéria-prima CMS e os resultados foram semelhantes aos obtidos por Fonkwe e Singh (1996), que utilizando as mesmas condições de hidrólise para um substrato diferente (resíduos de carne mecanicamente separada de peru) apresentaram um grau de hidrólise entre 65-70%, demonstrando com isto a eficiência hidrolítica desta enzima.

Himonides, Taylor e Morris (2011), utilizaram papaína para hidrolisar diferentes partes de peixes incluindo cabeças e retalhos e obtiveram um grau de hidrólise que variou de 71% a 86%.

Segundo Fellows (2006), a medida da atividade de água é de fundamental importância para o controle de qualidade dos alimentos visto que, por meio dela, podem ser previstas reações químicas, enzimáticas e desenvolvimento de microrganismos. Portanto, os hidrolisados obtidos após o processo de hidrólise foram submetidos ao processo de liofilização e apresentaram características de pó com valores de atividade de água que variaram de 0,1361 para o hidrolisado de CMS obtido com a Flavourzyme a 0,3273 para o hidrolisado de CMD obtido com a Protamex. Kurozawa et al. (2009), relataram um valor de atividade de água de 0,43 ao estudarem o efeito dos agentes de suporte durante a secagem por pulverização sobre as propriedades físico-químicas de um hidrolisado proteico de carne de frango obtido pela ação da Alcalase[®] 2.4L.

A composição proximal dos hidrolisados obtidos da CMS e da CMD com as três enzimas (Papaína, Flavourzyme e Protamex) variaram estatisticamente para todas as análises realizadas (umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e valor calórico). O teor de umidade está relacionado às metodologias de secagem e influenciam a vida de prateleira dos mesmos (BUENO-SOLANO et al., 2009) e neste caso estão condizentes com a maioria dos trabalhos realizados em hidrólise e proteínas de peixes, ou seja menores que 10% (CHALAMAIAH et al., 2010). E também abaixo do

valor de 10%, valor recomendado para este tipo de produto segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2005).

As elevadas concentrações de cinzas para os hidrolisados obtidos da CMS e CMD com as enzimas Flavourzyme e Protamex, de 10,38% a 12,86%, justificam-se pelo ajuste do pH no início do processo de hidrólise.

O ajustamento do pH para uma melhor ação das enzimas foi relatado por vários autores (DINIZ e MARTIN, 1997; LICEAGA e LI-CHAN, 1999; NEVES, MIRA e MARQUEZ, 2004; MARTINS, COSTA e PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2009). Rossi (2007), apresentou 34,25% de cinzas para um hidrolisado de carne mecanicamente separada de frango obtido por hidrólise com a enzima Alcalase 2,4 L FG, no qual o pH foi ajustado com NaOH 1,0M ou HCl 1,0 M de acordo com o planejamento experimental utilizado. Porém, elevadas concentrações de cinzas podem limitar a aplicabilidade industrial do hidrolisado (SHAHIDI et al., 1995;. SLIZYTE et al, 2005; PICOT et al., 2006).

O conteúdo de lipídeos variou de 3,27% para a CMD (Protamex) a 10,34% para a CMS (Papaína), estes valores foram maiores que os relatados por Hamid et al., (2002), de 2,8% de lipídeos em um hidrolisado de peixe em pó (tilápia) com a enzima Alcalase e por Rossi (2007) que obteve 0,95% de lipídeos para o hidrolisado obtido da carne mecanicamente separada de frango com a enzima Alcalase 2,4 L FG.

As proteínas proporcionam aminoácidos essenciais, e cumprem requerimentos tanto de ordem funcional como nutricional (LICEAGA-GESUALDO e LI-CHAN,1999). Teores elevados de proteínas foram obtidos nos hidrolisados tanto de CMS quanto de CMD, corroborando a sua utilização em inúmeros produtos alimentícios.

O conteúdo de proteína dos hidrolisados liofilizados provenientes da CMS e obtidos com uso da Papaína e da Protamex não diferiram estatisticamente, porém o teor de proteínas do hidrolisado obtido com a Flavourzyme apresentou-se menor e diferiu ($p < 0,05$) de ambos. Os teores de proteínas dos hidrolisados liofilizados obtidos da CMD com as enzimas Flavourzyme e Protamex mostram que os resultados foram semelhantes, porém diferiram ($p < 0,05$) significativamente do resultado do hidrolisado obtido com a Papaína. Os teores de proteínas encontrados nos hidrolisados apresentaram-se semelhantes aos valores relatados em estudos

que indicam como matéria prima cabeças e carne mecanicamente separada de frango (SURÓWKA; FIK, 1994; SOARES et al., 2000).

Webster et al.,(1982), relatou um percentual de 85% de proteína solúvel em um estudo realizado com vísceras de animais hidrolisadas com 2% de papaína. Sales et al.,(1991), obteve 83% de proteína em um hidrolisado obtido a partir de resíduo de carne mecanicamente separada com papaína. SCHMIDT (2008), apresentou teores de proteínas entre 42,33 e 65,99% para hidrolisados obtidos de carne de frango (peito e coxa) com a utilização de Alcalase e Flavourzyme.

Os rendimentos apresentados neste estudo após o processo de hidrólise enzimáticas da matéria-prima CMS foram de 10,98%, 6,75% e 8,42% para a Papaína, Flavourzyme e Protamex, respectivamente. Para a CMD os rendimentos encontrados foram de 10,55%, 4,84% e 10,32% para a Papaína, Flavourzyme e Protamex, respectivamente.

Vários são os fatores que podem influenciar neste dado, desde variações de temperatura, pH até as diferentes técnicas de secagem empregadas para obter o hidrolisado.

Rossi (2007), obteve um valor maior de rendimento (13,7%) utilizando *spray-drier* de um hidrolisado obtido de carne mecanicamente separada de frango com a enzima Alcalase 2.4 FG. Porém, o processo de secagem com altas temperaturas pode ocasionar uma diminuição da qualidade do produto. Isto foi observado por Hamid et al.,(2002), em uma pesquisa de hidrólise de tilápia, na qual estes autores utilizaram duas temperaturas de secagem 150°C/76°C e 180°C/90°C (entrada/saída) e constataram uma maior diminuição de aminoácidos (lisina e treonina), além da diminuição de proteínas. O rendimento relatado nesta pesquisa foi de 9,6%.

As propriedades funcionais das proteínas hidrolisadas são dependentes da extensão de clivagem proporcionada pelas enzimas proteolíticas. As funcionalidades apresentadas pelos hidrolisados também são influenciadas pela especificidade da enzima utilizada, pela natureza física e química da proteína intacta e pelas condições de pH, temperatura durante o processo de hidrólise (MAHMOUD, 1994).

A solubilidade proteica é uma das mais importantes propriedades físico-químicas dos hidrolisados proteicos, a ponto de determinar a sua utilização em diferentes sistemas alimentícios. A maior capacidade de solubilidade de um hidrolisado é devido ao menor tamanho de suas moléculas, comparada com a proteína intacta, e aos grupos amino e carboxila ionizáveis dos aminoácidos recém-

expostos, que aumentam a hidrofiliçidade do hidrolisado, e isto está relacionado com o grau de hidrólise (MULLALLY *et al.*, 1994).

A solubilidade proteica do hidrolisado liofilizado obtido com a Papaína foi significativamente maior ($p < 0,05$) para a CMS, nos pHs 3,0 e 9,0 quando comparado com a CMD, já que com esta matéria-prima o grau de hidrólise foi menor. Os menores valores de solubilidade proteica foram obtidos com a Flavourzyme e com a Protamex. Não ocorreram alterações significativas ($p < 0,05$) da solubilidade proteica entre as matérias-primas CMS e CMD com a enzima Flavourzyme, já com a Protamex esta diferença ($p < 0,05$), ocorreu nos pHs 5,0 e 7,0 .

Roman e Sgarbieri (2005), realizaram um estudo sobre as propriedades funcionais da caseína bovina hidrolisada com a enzima Flavourzyme, e obtiveram maior valor de solubilidade com o hidrolisado de maior grau de hidrólise e concluíram que a medida de hidrólise altera de forma significativa as propriedades interfásicas dos hidrolisados.

O aumento da solubilidade dos hidrolisados é devido, provavelmente, a diminuição do tamanho das moléculas e corresponde ao aumento da exposição de grupos hidrofílicos amino e carboxil ionizáveis (CLEMENTE *et al.*, 2000; ROMAN e SGARBIERI, 2005).

Segundo Donadel e Prudêncio-Ferreira (1999), a capacidade de retenção de óleo varia em função do número de grupos hidrofóbicos expostos da proteína. A absorção da gordura é facilitada pela afinidade entre as cadeias laterais não polares das proteínas que têm afinidade com as cadeias hidrofóbicas da molécula de gordura.

Neste trabalho observou-se que os valores de capacidade de retenção de óleo foram significativamente ($p < 0,05$) menores para os hidrolisados que possuem maior grau de hidrólise, neste caso os obtidos com a Papaína e a Protamex. A origem da matéria-prima não interferiu significativamente ($p < 0,05$), para a capacidade de retenção de óleo dos hidrolisados liofilizados obtidos com a Papaína e a Flavourzyme. Entretanto, no hidrolisado obtido com a Protamex ocorreram diferenças ($p < 0,05$), entre as matérias-primas utilizadas.

Os resultados encontrados neste estudo concordam com os resultados obtidos por Schmidt (2008), pois este pesquisador também verificou uma melhoria desta propriedade somente nos hidrolisados de coxa de frango com a enzima

Flavourzyme, apresentando um aumento na capacidade de retenção de óleo em relação à carne *in natura*.

A capacidade de retenção de água da carne é uma propriedade de grande importância nos processos tecnológicos e depende do pH e do meio iônico. A capacidade de retenção de água envolve uma interação entre a proteína ou alimentos proteicos com a água (BELITZ ; GROSCH, 1997; SGARBIERI, 1998).

A matéria-prima influenciou significativamente ($p < 0,05$), a capacidade de retenção de água dos hidrolisados obtidos com as três enzimas nos diferentes pHs. O hidrolisado que apresentou os maiores valores de capacidade de retenção de água foi o obtido com a enzima Flavourzyme na CMS. Estes resultados concordam com os dados encontrados por Schmidt e Salas-Mellado (2009), que atribuem isto as características da Flavourzyme possuir atividade especialmente exopeptídica, e desta forma liberar aminoácidos com grupo carboxi-terminal, portanto, os hidrolisados obtidos com esta enzima possuem alto conteúdo de aminoácidos livres e, principalmente devido ao menor grau de hidrólise, devem possuir peptídeos de alto peso molecular que irão determinar melhores propriedades de capacidade de retenção de água.

Fonkwe e Singh (1996), apresentaram baixos valores de capacidade de retenção de água quando hidrolisaram resíduos de carne de peru mecanicamente separada com papaína, que também é uma endoproteínase, neste estudo os valores foram inferiores a 0,5 mL água/g proteína.

Schmidt (2008), observou uma relação inversa do grau de hidrólise dos hidrolisados com a capacidade de retenção de água, porém no presente trabalho a menor capacidade de retenção de água ocorreu com os hidrolisados oriundos da CMD, que possuíam um menor grau de hidrólise.

A capacidade de emulsificação de um hidrolisado é normalmente definida como o volume de óleo (mL) que pode ser emulsionado pela quantidade de hidrolisado protéico (g), antes que ocorra inversão da fase ou colapso da emulsão (KRISTINSSON ; RASCO, 2000a).

O hidrolisado obtido com a enzima Flavourzyme apresentou uma capacidade emulsificante significativamente maior ($p < 0,05$) (9,27mL/g), em relação aos hidrolisados obtidos com a Papaína e a Protamex, oriundos da CMS. O que concorda com vários trabalhos que relacionam a capacidade emulsificante dos hidrolisados proteicos com o grau de hidrólise destes, sendo esta propriedade é

inversamente proporcional ao grau de hidrólise (QUAGLIA; ORBAN, 1990; MAHMOUD; MALONE; CORDLE, 1992; KRISTINSSON ; RASCO, 2000a; GBOGOURI et al., 2004).

Para a CMD, o hidrolisado que apresentou maior ($p < 0,05$) capacidade emulsificante foi aquele obtido com a Papaína, seguido dos obtidos com a Flavourzyme e a Protamex.

O grau de hidrólise e a especificidade da enzima são fatores que influenciam muito nas propriedades emulsificantes. O tamanho dos peptídeos também influencia a estabilidade da emulsão e desta forma os peptídeos maiores promovem uma maior estabilidade da emulsão (PANYAM; KILARA, 1996). Geralmente a hidrólise parcial das proteínas aumenta o número de grupos polares e hidrofílicos, diminuindo o peso molecular, o que deforma a estrutura globular das proteínas, podendo expor maior número de grupos hidrofóbicos. Uma hidrólise extensiva das proteínas resulta em uma drástica perda das propriedades funcionais de superfície (ROMAN; SGARBIERI, 2005).

Os hidrolisados obtidos a partir da CMD com a Protamex apresentaram o maior ($p < 0,05$) percentual (42,10%) de estabilidade de emulsão, seguido dos obtidos com a Papaína e a Flavourzyme.

Kristinsson e Rasco (2000c), obtiveram em torno de 50% de estabilidade de emulsão para hidrolisados proteicos de pescado com as enzimas Alcalase e Flavourzyme e esta estabilidade foi maior para o hidrolisado com menor grau de hidrólise.

De acordo com Quaglia e Orban (1990), hidrolisados com diferentes distribuições de pesos moleculares demonstraram que um conteúdo maior de frações proteicas de alto peso molecular desempenha um papel importante no que diz respeito à estabilização da emulsão. Hidrolisados com baixo grau de hidrólise possuem uma hidrofobicidade de superfície maior demonstrando serem melhores emulsificantes comerciais.

Os hidrolisados proteicos constituem uma promissora alternativa como ingrediente no desenvolvimento de formulações para pacientes com necessidades nutricionais diferenciadas (CLEMENTE, 2000).

O número de resíduos de aminoácidos remanescentes nas cadeias peptídicas depois do processo de hidrólise é uma característica essencial na produção de

hidrolisados de proteínas com propriedades funcionais específicas (XIA; WANG; XU, 2007).

Além disto, hidrolisados proteicos encontram aplicações, principalmente no tratamento nutricional de indivíduos que não conseguem digerir proteínas intactas. Várias são as aplicações dos hidrolisados proteicos, em formulações para lactentes com hipersensibilidade alimentar, na preparação de produtos de geriatria, suplementos energéticos, dietas para controle de peso ou ainda em dietas terapêuticas ou entéricas, melhorando as propriedades nutricionais e/ou funcionais (FROKJAER, 1994).

Na avaliação dos teores de aminoácidos apresentados pelos três hidrolisados obtidos a partir da CMS e da CMD evidencia-se que a Papaína produz um hidrolisado com maior teor de aminoácidos essenciais quando comparado com as outras enzimas utilizadas no experimento, com exceção para o triptofano. Em comparação aos valores preconizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para crianças de 2 a 5 anos e para adultos, a enzima que proporcionou maior quantidade de aminoácidos equivalendo-se a estas recomendações foi a Papaína. Porém, Sgarbieri (1996), ressalta que as metodologias utilizadas para quantificar aminoácidos que utilizam reagentes ácidos podem acarretar a destruição do triptofano, recomendando a utilização de outra metodologia para este aminoácido.

O teor de aminoácidos apresentado pelo hidrolisado produzido a partir da hidrólise da CMS com a Papaína assemelha-se com os resultados divulgados no trabalho de Rossi et al., (2009), no qual estes autores avaliaram biologicamente o hidrolisado proteico obtido de carne de galinha desossada mecanicamente.

Hamid et al., (2002), utilizaram Alcalase para obter um hidrolisado de tilápia negra (*Oreochromis mossambicus*) e obtiveram uma composição de aminoácidos semelhante aos valores preconizados pela FAO (1985).

Os micronutrientes como vitaminas e minerais são extremamente importantes na dieta humana e animal. Os minerais particularmente são elementos inorgânicos vastamente difundidos na natureza e que, no organismo, desempenham uma multiplicidade significativa de funções metabólicas que incluem ativação, regulação, transmissão e controle (WILLIAMS, 1997).

A utilização de suplementos e a fortificação de alimentos com minerais surgem como uma estratégia de prevenção e combate a algumas deficiências nutricionais, como a anemia e a osteoporose (LOBO; TRAMONTE, 2004).

Os teores de cálcio encontrados neste trabalho foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) para as três enzimas estudadas na CMS, enquanto que na CMD somente a Papaína foi significativamente diferente. Os liofilizados obtidos com a Papaína apresentaram os maiores valores para cálcio (128,00mg/100g/CMS; 127,25mg/100g/CMD). Esses valores foram inferiores ao relatado por Fonkwe e Singh (1996), (212,10mg/100g de cálcio), obtido de hidrolisado de resíduo carne mecanicamente separada de peru com a utilização da enzima Papaína. Pinto e Silva et al., (2008), trabalhando com hidrolisados de carne bovina, de peru, e frango obtidos com o suco de abacaxi (bromelina), encontraram valores de 8, 20; 10, 30 e 7,50 mg/100g respectivamente de cálcio.

O ferro não variou significativamente ($p \leq 0,05$) entre os hidrolisados proteicos provenientes da CMS e da CMD. Apesar das matérias-primas não terem sido comparadas estatisticamente, a CMS não apresentou maiores percentuais de ferro, como era esperado, pois a CMS obtida por separação mecânica possui maiores quantidades de lipídeos e de hemoglobina da medula óssea (McMINDES; SIEDLER, 1988).

A média dos valores encontrados de ferro nos três diferentes hidrolisados proteicos obtidos de CMS e de CMD, corresponderam a 26,56% e 41,95%, da RDA respectivamente. Teor maior de ferro (12,43mg/100g) foi encontrado por Bueno-Solano (2009), em um hidrolisado obtido por fermentação de resíduos de camarão.

Torres-Fuentes, Alaiz e Vioque (2011), avaliaram a purificação e a atividade quelante de cobre dos hidrolisados obtidos de grão de bico e constataram que o tamanho da fração não é um fator determinante na atividade, mas que geralmente esta era maior em frações de menor tamanho, indicando a importância do grau de hidrólise.

Os teores de zinco não variaram significativamente ($p \leq 0,05$) entre as enzimas para a CMS, enquanto para a CMD, a Papaína e a Flavourzyme deferiram significativamente ($p \leq 0,05$). Os valores encontrados correspondem a 23,05% da ingestão diária recomendada (1989). Fonkwe e Singh (1996), que encontraram 1,4mg/100g de hidrolisado de resíduo de carne mecanicamente separada de peru .

O zinco está presente em enzimas e proteínas que participam do metabolismo de proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucléicos, desempenhando tanto função catalítica como estrutural (HAMBIDGE, 2000; MAFRA, COZZOLINO, 2004).

Os teores de sódio e fósforo variaram entre os hidrolisados obtidos com a Flavourzyme e Protamex independente da matéria-prima utilizada, devido ao ajustamento de pH. Além deste ajuste a enzima Protamex utiliza como estabilizante cloreto de sódio (NOVOZYMES, 2009).

Os níveis aumentados de cloro e de potássio ($p \leq 0,05$) para os hidrolisados obtidos com a Flavourzyme e Protamex, tanto na CMS quanto na CMD, são explicados pela utilização de cloreto de potássio e cloreto de sódio, respectivamente, como estabilizantes para as enzimas (NOVOZYMES, 2009).

Os teores de magnésio, não variaram significativamente ($p \leq 0,05$) entre as enzimas para as duas matérias-primas analisadas (CMS e CMD) e estes foram superiores aos relatados por Fonkwe e Singh (1996), que encontraram 67,3mg/100g de magnésio em um hidrolisado obtido a partir de resíduo de carne mecanicamente separada de peru.

6 CONCLUSÃO

Considerando as condições utilizadas e os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- A utilização de carne mecanicamente separada (CMS) e de carcaça manualmente desossada (CMD) de frango é viável como substrato para a produção de hidrolisados proteicos utilizando como enzimas proteolíticas Papaína, Flavourzyme e Protamex.

- O maior rendimento apresentado para os hidrolisados proteicos foram os obtidos com a Papaína, seguidos da Protamex e os menores rendimentos foram obtidos com a enzima Flavourzyme, independente da matéria-prima utilizada como substrato.

- Analisando a composição proximal do hidrolisado proteico obtido com a CMS observa-se que os hidrolisados obtidos com a Papaína obtiveram maior teor proteico, de sólidos solúveis e menor teor de cinzas quando comparados com outros hidrolisados. Os teores de proteínas dos hidrolisados liofilizados obtidos da CMD com as enzimas Flavourzyme e Protamex mostraram resultados semelhantes, porém o maior percentual de proteínas também foi obtido com a Papaína. Os maiores teores de cinzas foram encontrados nos hidrolisados obtidos com as enzimas Flavourzyme e Protamex, pois as mesmas requerem um ajuste de pH no processo de hidrólise.

- Quanto ao grau de hidrólise observa-se que no experimento com a CMS obteve-se hidrolisados com diferentes valores de grau de hidrólise, e a enzima Papaína apresentou o melhor comportamento, seguida da Protamex e da Flavourzyme. Já para a CMD a enzima Protamex apresentou o melhor comportamento, seguida da Papaína e da Flavourzyme.

- A composição de aminoácidos demonstrou que os hidrolisados obtidos com Papaína possuem uma composição mais próxima da recomendada pelos órgãos de controle, tanto para a CMS como para a CMD.

- A pesquisa sobre os elementos minerais dos hidrolisados proteicos liofilizados obtidos a partir da CMS e da CMD revela que estes possuem minerais importantes para a manutenção da saúde, quando utilizados em formulações especiais. Possivelmente estes hidrolisados possuam peptídeos bioativos que têm

como função a quelação de minerais, o que pode tornar-se interessante na formulação de alimentos fortificados, porém estes precisam ser pesquisados e quantificados futuramente.

- As propriedades funcionais dos hidrolisados obtidos da CMS e CMD mostraram-se diferenciadas para cada enzima e matéria-prima, principalmente pelo grau de hidrólise individualizado apresentado pelas diferentes enzimas. A solubilidade proteica aumentou com o aumento do grau de hidrólise e o hidrolisado que apresentou maior solubilidade foi com a CMS e com a papaína como enzima. A maior capacidade de retenção de água foi apresentada pelo hidrolisado obtido com a enzima Flavourzyme na CMS, já que esta propriedade é inversamente proporcional ao grau de hidrólise, igualmente a capacidade de retenção de óleo foi maior para a Flavourzyme, nas duas matérias-primas utilizadas. A capacidade emulsificante também foi maior para a Flavourzyme na CMS, já que esta propriedade também depende do grau de hidrólise.

- Assim, com base nos resultados obtidos no presente estudo pode-se presumir que os hidrolisados proteicos obtidos com matérias-primas comuns na indústria cárnea podem originar uma matéria-prima promissora na formulação de dietas especiais, principalmente pelo alto percentual de proteínas. Porém, várias análises necessitam ser realizadas para atestar com segurança o controle de qualidade como a oxidação lipídica, o controle microbiológico e avaliação sensorial, além da avaliação das possíveis propriedades bioativas destes hidrolisados.

7 REFERÊNCIAS

ABERT, T.; KNEIFEL, W. Physicochemical and functional properties of casein hydrolysates obtained by treatment with different enzymes. In: IDF (Inter. Dairy Fed.) **Sem. Prot. Fat Glob Modif.**, p. 97-105, 1993.

ABEF - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGO. ABEF on line. Disponível em: <[http:// www.abef.com.br](http://www.abef.com.br)>. Acesso em: 03 agosto de 09.

ADLER-NISSEN, J. **Enzimic hydrolysis of food proteins**: elsevier applied science. Barking: Elsevier Applied Science, 1986. 427 p.

AGBOOLA, S.O.; SINGH, H.; MUNRO, P.; DALGLEISH, D.G.; SINGH, A.M.; Destabilization of oil-in-water emulsions formed using highly hydrolyzed whey proteins. **J Agric Food Chem**, n. 46, pp. 84–90, 1998.

AHHMED A.M.; MUGURUMA, M.; A review of meat protein hydrolysates and hypertension, **Meat Science**, n. 86, pp. 110–118, 2010.

AHN, C.; LEE, K.; JE, J. Enzymatic production of bioactive protein hydrolysates from tuna liver: effects of enzymes and molecular weight on bioactivity. **International Journal of Food Science and Technology**, n. 45, pp. 562–568, 2010.

AKIYAMA, H.; SAKATA K.; YOSHIOKA Y.; MURATA Y.; ISHIHARA Y.; TESHIMA R.; SAWADA J.; MAITANI T. Profile analysis and immunoglobulinand reactivity of wheat protein hydrolysates. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 140, n. 1, p. 36-42, 2006.

AL-SHEHRI,M., ABDULRAHMAN; MOSTAFA,YASSER,S. Production and some properties of protease produced by *Bacillus licheniformis* isolated from Tihamet Aseer, Saudi Arabia. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v.7, n.9, p.1631-1635, 2004.

ARAÚJO FILHO, G. C. et. al. **Produtor de mamão**: Fortaleza: Edições Demócrito Rocha; Instituto Centro de Ensino Tecnológico, 2002. 72p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGO (ABEF). **ABEF on line**. Disponível em: <[http:// www.abef.com.br](http://www.abef.com.br)>. Acesso em: 03 agosto de 09.

AVISITE, **EUA**: tendências de produção, consumo e exportação de frango em 2014. Campinas - SP, 25 de julho de 2013.

BARBUT, S. **Poultry products processing**: an industry guide. Boca Raton: CRC Press,2002.

BARRET, A. J.; RAWLINGS, N. D. Evolutionary lines of cysteine peptidases. **Biological Chemistry**, v. 382, n. 5, p. 727-733, 2001.

BEAULIEU, L.; THIBODEAU, J.; BRYL, P.; CARBONNEAU, M. E. Proteolytic processing of herring (*Clupea harengus*): biochemical and nutritional characterisation of hydrolysates. **International Journal of Food Science and Technology**, n. 44, pp. 2113–2119, 2009.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza – Espanha: Editora Acribia S. A., 1997.

BENÍTEZ, R.; IBARZ, A.; PAGAN, J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. **Acta Bioquím Clín Latinoam**. Argentina, v. 42, n. 2, p. 227-36, 2008.

BERAQUET, N.J. Panorama da carne de frango mecanicamente separada. *Avicultura Industrial*, p.75-79, 1989.

BHASKAR, N.; MODI, V. K.; GOVINDARAJU, K.; RADHA, C.; LALITHA, R. G.; Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. **Bioresource Technology**, England, v. 98, n. 2, p. 388-394, 2007.

BJÖRK I, YLINENJÄRVI K. Interaction between chicken cystatin and the cysteine proteinases actinidin, chymopapain A, and ficin. **Biochemistry**, v. 29, n. 7, pp. 1770–1776, 1990.

BRASIL, Ministério da agricultura. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 273, de 22 de setembro de 2005**: aprova o "pós para o preparo de alimentos". Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/agua_sub/arquivos/RDC_274_2005.pdf>. Acesso em 15 jul.2013.

_____. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada (CMS) de aves, bovinos e suínos. **Diário Oficial**, Brasília, 05 abr. p.6-7. Instrução Normativa, 4 - Anexo 1, 2000.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Relatório de avaliação dos objetivos setoriais e dos programas do plano plurianual 2008-2011, Ano Base 2010**. Brasília, DF, 2011.

BUENO-SOLANO, C.; LOPEZ-CERVANTES, J.; CAMPAS-BAYPOLI, O. N.; LAUTERIO-GARCIA, R.; ADAN-BANTE, N. P.; SANCHEZ-MACHADO, D. I. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. **Food Chemistry**, n. 112, pp. 671–675, 2009.

CÂNDIDO, L.M.B.; SGARBIERI, V.C. A hidrólise enzimática de tilápia do Nilo (*Oreochromus niloticus*) proteínas miofibrilares: efeitos sobre propriedades nutricionais e hidrofílico. **J. Sci. Food Agric.**, n. 83, pp. 937-944, 2003.

CENTEC. INSTITUTO CENTRO DE ENSINO TECNOLÓGICO. **Produtor de mamão**. 2 ed. FORTALEZA: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2004. p. 72.

CHALAMAIAH, M.; NARSINGRAO, G.; RAO, D. G.; & JYOTHIRMAYI, T. Proteinhydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. **Food Chemistry**, 120, 652–657, 2010.

CHEFTEL, J-D.; CUQ, J-L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias: bioquímica - propiedades funcionales - valor nutricional - modificaciones químicas**. Acibia, 1989. 345p.

CHEN, H.M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; FUJIMOTO, K.; NOKIHARA, K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 46, pp. 49–53, 1998.

CHOBERT, J-M.; BERTRAND-HARB, C.; DALGALARRANDO, M.; NICOLAS, M-G., Solubility and emulsifying properties of betacasein modified enzymatically by trypsin **J. Food Biochem.**, v. 13, n. 2, pp. 335-352, 1989.

CLEMENTE A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends Food Sci Technol.**, v. 11, n. 7, pp. 254-62, 2000.

CONSIDERA, C.M.; SOUSA, E.L.L.; BRAÇAL, G. **Âncora verde: o papel da agricultura no ajuste econômico**. Brasília: SEAE/MF, dez./2002.

CORRÊA, A.P.F. **Obtenção de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de caseinato ovino e soro de queijo ovino**. Tese (Doutorado). Universidade do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

CREAMER, L.K.; OLSON, N.F. Rheological evaluation of maturing cheddar cheese. **J. Food Sci.** v. 47, p. 631-636, 1982.

DEKKERS, E.; RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G.; MARSHALL, M. R. Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates. **Food Chemistry**, n. 124, pp. 640–645, 2011.

DINIZ, F.M.; MARTIN, A.M. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein. Composition of the hydrolysates. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v.48, p.191-200, 1997.

DONADEL, M. E.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Propriedades funcionais de concentrado protéico de feijão envelhecido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 19, p. 380 - 386, 1999.

DUAN, Z.; WANG, J.; YI, M.; YIN, A. Recovery of proteins from silver carp byproducts with enzymatic hydrolysis and reduction of bitterness in hydrolysate. **Journal of Food Process Engineering**, n. 33, pp. 962–978, 2010.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2000. 652p.

FAO, OECD. **OECD-FAO: Agricultural outlook 2010-2019**. Paris, FR, 2010. 247p.

FARINA, E. M. M. Q.; NUNES, R. Âncora verde e os ajustamentos microeconômicos no sistema agro-industrial de alimentos no Brasil pós-Real. In: XXX Encontro Nacional de Economia. **Anais...** Nova Friburgo, 2002.

FELLOWS,P.J. **Tecnologia do Processamento dos Alimentos: Princípios e Práticas**. Tradução Florencia Cladera Oliveira. et al. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.602p.

FIELD, R.A. Mechanically separated meat, poultry and fish. In: PEARSON, A.M.; DUTSON, T.R. (Ed.) **Edible meat by-products**. New York: Elsevier Applied Science, 1988. pp. 83-128,

FONKWE,L.G.; SINGH,R.K. Protein recovery from mechanically Deboned Turkey residue by Enzymic Hydrolysis. **Process Biochemistry**, Watford, n. 6, pp. 605-616, 1996.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Energy and protein requirements: Report of a joint FAO/WHO/ UNU expert consultation**. World Health Organization. Geneve: World Health Organization; 1985.

_____. **FAO faostat**. Disponível em: <<http://www.faostat.org.br>>. Acesso em: 20 set.2009.

FREITAS, O.; PADOVAN, G.J.; VILELA, L.; SANTOS,J.E.D.; OLIVEIRA, J.E.D.; GREENE, L.J. Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition. **J. Agric. Food Chem.**, v. 41, pp.1432- 1438, 1993.

FROKJAER, S. Use of hydrolysate for protein supplementation. **Food Technology**, v. 48, n. 10, pp. 86-88, 1994.

FRONING, G. W. Mechanical deboning of poultry and fish. **Advances in food Research.**, v. 27, pp. 109-147. 1981.

FURTADO, M.A.M.; GOMES, J.C.; SILVA, C.A.S.; ORNELLAS, C.B.; SILVESTRE, M.P.C. Propriedades funcionais de hidrolisados de proteína láctea co-precipitada. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.25, n.3, pp. 625-639, 2001.

GIESE, J. Proteins as ingredients: types, functions,applications. **Food Techonology**, Chicago,v.48, n.10, pp.50-60.1994.

GOBBETTI, M. ; STEPANIAK, L.; DE ANGELIS, M.; CORSETTI, A.; DI CAGNO, R. Latentbioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n. 42, pp. 223–239, 2002.

GBOGOURI, G. A.; LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproduct hydrolysates. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 8, pp. 615–622, 2004.

GONÇALVES, R. M. et al., Avaliação físico-química e conteúdo de metais pesados em carne mecanicamente separada (CMS) de frango e de bovino produzidas no estado de Goiás, **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 553-559, abr./jun. 2009.

GRZONKA, Z. et al. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitor. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 1, 2001.

HAMBIDGE M. Human Zinc Deficiency. **J Nutr**, n. 130, pp. 1344-49, 2000.

HAMID, A.; BAKAR, J.; BEE, G. H. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Food Chem.**, v. 78, n. 1, pp. 69-74, 2002.

HERPANDI, HUDAN.; ROSMA, A.; WAN NADIAH, W. A. Degree of hydrolysis and free tryptophan content of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) protein hydrolysates produced with different type of industrial proteases. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 3, pp. 863-867, 2012.

HIMONIDES, A.T.; TAYLOR, A.K.D.; MORRIS, A.J. Enzymatic hydrolysis of fish frames using pilot plant scale systems. **Food and Nutrition Sciences**, n. 2, pp. 586-593, 2011.

JE, J.Y.; QIAN, Z.J.; LEE, S.H.; BYUN, H.G.; KIM, S.K. Purification and antioxidant properties of Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*) dark muscle peptide on free radical-mediated oxidative systems. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 4, pp. 629-637, dec. 2008.

JUNIOR, C. J.; LIMA DE PAULA, S.R.; ORMOND, J. G. P.; BRAGA, N.M. A cadeia da carne de frango: tensões, desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 26, p. 191-232, set. 2007.

KANNAN, A.; HETTIARACHCHY, N. S.; MARSHALL, M.; RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. Shrimp shell peptide hydrolysates inhibit human cancer cell proliferation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 91, pp. 1920-1924, 2011.

KHALED, H. B.; KTARI, N.; GHORBEL-BELLAJ, O.; JRIDI, M.; LASSOUED, I.; NASRI, M. Composition, functional properties and in vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from sardinelle (*Sardinella aurita*) muscle. **Journal of Food Science and Technology**, p. 1-12, 2011.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 43, 2000a.

_____. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo solar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry**. v. 36, p. 131 - 139, 2000b.

_____. Biochemical and functional properties of atlantic salmon (*Salmo solar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 48, p. 657 - 666, 2000c.

KTARI,N.;JRIDI,M.;BKHAIRIA ,I.; SAYARI ,N.SALAH ,R.B.;NASRI, M. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from muscle of zebra blenny (*Salaria basilisca*) obtained with different crude protease extracts **Food Research International**, n. 49, pp. 747–756, 2012.

KUMAR, S.; PEDERSEN-WISMER, J.; CASPERSEN, C. Effect of raw materials, deboning methods and chemical additives on microbial quality of mechanically deboned poultry meat during frozen storage. **Journal of Food Science and Technology**, New Jersey, v. 23, n. 4, p. 217-220, 1986.

KUROZAWA, L. E. PARK, K. J. HUBINGER, M. D. Effect of carrier agents on the physicochemical properties of a spray dried chicken meat protein hydrolysate, **Journal of Food Engineering**. 94, 326–333, 2009.

LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 68-71, 1994.

LI, F.Y; XING, Y.J.; DING, X.. Immobilization of papain on cotton fabric by sol-gel method. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1692-1697, 2007.

LIASET, B.; NORTVEDT, R.; LIED, E; ESPE, M. Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of atlantic salmon (*Salmo salar, L.*) frames by protamex protease. **Process Biochem**, n. 37, pp. 1263–1269, 2002.

LICEAGA-GESUALDO, A.M.; LI-CHAN, E.C.Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*clupea harengus*). **J. Food Sci.**, v.64, n.6, p.1000-1004, 1999.

LIU,Q.; KONG, B.; XIONG,Y.L.; XIA, X.Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis, **Food Chemistry**, n. 118, pp. 403–410, 2010.

LOBO, A.S.;TRAMONTE, V.L.C. Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais, **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 17, n. 1, pp. 107-113, jan./mar. 2004.

MACHADO, D. D. G. **Cadeia produtiva da avicultura-situação e perspectivas**. Brasil: IICA-Instituto Interamericano de Cooperação para Agricultura, 2007. 142 p. (Informe Agronegócio, 3).

MAFRA, D.; COZZOLINO, S M F. Importância do zinco na nutrição humana. **Rev Nutr**, v. 17, pp. 79-87, 2004.

- MAHMOUD, M. I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technology**. v. 58, p. 89 - 95, 1994.
- MAHMOUD, M.I.; MALONE, W.T.; CORDLE, C.T. Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. **J. Food Sci.**, v. 57, pp. 1223-1229, 1992.
- MARTINELLI, O. ; SOUZA, J. M. **Relatório setorial: carne de frango**. BNDES, RJ, ago. de 2005.
- MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*) **Química Nova**, Vol. 32, No. 1, 61-66, 2009.
- McMINDES, M. K.; SIEDLER, A. J. Nitrite mode of action: inhibition of yeast pyruvate decarboxylase (E.C. 4.1.1.1) and clostridial pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (E.C. 1.2.7.1) by nitric oxide. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 53, n. 3, p. 917-919-931, 1988.
- MIRA, N. V. M.; MARQUEZ, U. M. L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. **Rev. Saúde Pública**, v. 34, n.1, p.86-96, 2000.
- MÖLLER, N.P.; SCHOLZ-AHRENS, K, E.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, v. 47, pp.171-182, 2008.
- MORRISEY, P. A. et al. Lipid stability in meat and meat products. **Meat Science**, Oxford, v. 49, n. Suppl. L, pp. S73-S86, 1998.
- MOTTA, C. **México aceita garantias sanitárias para importação de carne de frango do Brasil**. Comercio Internacional, Ministério da Agricultura. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2013/07/mexico-aceita-garantias-sanitarias-para-importacao-de-carne-de-frango-do-brasil>>. Acesso em: 03 .ago.2013.
- MULLALLY, M. M.; O'CALAGHAN, D. M.; FITZGERALD, R. J.; DONNELLY, W. J.; DALTON, J. P. Proteolytic and peptidolytic activities in commercial pancreatin protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolysate characteristics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 2973. 1994.
- MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Biotecnologia: enzimas ferramentas na indústria. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 242, out. 2007.
- NESSE, K. O.; NAGALAKSHMI, A. P.; MARIMUTHU, P.; MAMTA SINGH. Efficacy of a fish protein hydrolysate in malnourished children. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**. 2011.
- NEVES, R. A. M.; MIRA, N. V. M.; MARQUEZ, L. U. M. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 24, n. 1, pp. 101-108, 2004.

NIELSEN, P.M. Functionality of protein hydrolyses. In: DAMODARAM, Srinivasan; PARAF, Alain Paraf (Eds). **Food proteins and their applications**. New York: Macel Dekker, INC, pp. 443-472, 1997.

NUNES, P. T. **Efeito da pré-cura na estabilidade microbiológica da carne mecanicamente separada e elaboração de um produto reestruturado de filés de peito de galinhas de descarte**. 2003. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

NOVOZYMES. **Rethink Tomorrow**: ficha de informações de produtos e dados de segurança. Disponível em: <<http://www.novozymes.com>>. Acesso em: 15 out.2009.

OETTERER, M. **Produtos** Obtidos por Interferência na Fração Protéica do Pescado. Piracicaba: ESALQ, 2001.

OGAWA, N. B. P.; MAIA, E. L. **Manual de pesca**: ciência e tecnologia do pescado. São Paulo: Varela, 1999. 430p.

OLIVA-TELES, A.; CERQUEIRA, A. L.; GONÇALVES, P. The utilization of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. **Aquaculture**, n. 179, pp. 195–201, 1999.

OLIVEIRA, J.ED.; MARCHINI, J.S. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998. 403 p.

PACHECO, M. T. B.; DIAS, N. F. G.; BALDINI, V. L. S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, pp. 333-338, abr./jun. 2005.

PANYAM, D.; KILARA, A. Enchanting the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology International**, Cambridge, v.7, n.4, p.120-125,1996.

PAQUES, F.W.; MACEDO, G.A.. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n.1, p.93-99, 2006.

PEARCE, R.J. Food functionality: success or failure for dairy based ingredients. *Australian J. Dairy Technol.*, v. 50, p. 15-23,1995.

PEDERSEN, B. Removing bitterness from protein hydrolysates. **Food Technol.**, v. 48,p.96-99, 1994.

PICOT, L.; BORDENAVE, S.; DIDELOT, S.; FRUITIER-ARNAUDIN, I.; SANNIER, F.; THORKELSSON, G. et al. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. **Process Biochemistry**, n. 41, pp. 1217–1222,2006.

PIHLANTO, A.; KORHONEN, H. Bioactive peptides and proteins: advances. **Food Nutrition Research**, n. 47, pp. 175–276, 2003.

PINTO E SILVA, M.E.M.; PATON, I.; TRIGO, M.; VON ATZINGEN, M.C.B. C.; KIRA, C.S.; INOMATA, E.I.; LAMARDO, L.C.A. Mineral and vitamin content of beef, chicken, and turkey hydrolysates: mineral and vitamin content of protein hydrolysates. **Quim. Nova**, v. 31, n. 1, pp. 41-43, 2008.

QUAGLIA, G. B.; ORBAN, E. Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysates. **Journal of Food Science**. v. 55, p. 1571, 1990.

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V.C. Efeito da hidrólise enzimática sobre propriedades funcionais de caseína bovina coagulada pela ação da quimosina **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 25, n. 3, pp. 468-474, jul./set. 2005.

ROSSI, D. M. **Utilização de carne mecanicamente separada de frango para produção de um hidrolisado proteico a partir de enzimas microbianas**. 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

ROSSI, D.M.; FLÔRES, S.H.; VENZKE, J.G.; AYUB, M.A.Z. Biological evaluation of mechanically deboned chicken meat protein hydrolysate, **Revista de Nutrição**, Campinas, 22(6):879-885, nov./dez., 2009.

SAITO, M.; KIYOSE, C.; HIGUCHI, T.; UCHIDA, N.; SUZUKI, H. Effect of collagen hydrolysates from Salmon and Trout skins on the lipid profile in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 57, pp. 10477–10482, 2009.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; ISHIHARA, N.; JUNEJA, L.R. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system, **Food Chemistry**, n. 86, pp. 99–103, 2004.

SALES, A. M.; CARVALHO, A. C. V.; BALDINI, V. L. S.; GONÇALVES, J. R.; BERAQUET, J. N. Extração enzimática de proteína de resíduo de carne de frango mecanicamente separada. **Coletânea Ital**, Campinas, v.21, n.2, p.223-242, 1991.

SANGEETHA, K.; ABRAHAM, T.E.. Chemical modification of papain for use in alkaline medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.38, p.171-177, 2006.

SANTOS, M.F.; SANTOS NETO, A.L.C.; VASCONCELLOS, A.M.H. Hidrolisado enzimático para dietoterapia de fenilcetonúricos. **Biotechnol. Ciên. Desenv.**, v. 29, p.152-157, 2003.

SANTOS, S. D.; **Obtenção e avaliação de hidrolisado enzimático obtido a partir de pescado de baixo valor comercial**. Dissertação de Mestrado, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 2006.

SCHMIDT, C. G.; SALAS-MELLADO M.. Influência da ação das enzimas Alcalase e Flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango, **Química Nova**, v. 32, n. 5, pp. 1144-1150, 2009.

SCHMIDT, C.G. **Hidrólise enzimática das proteínas de carne de frango**, Tese (Doutorado). Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande, RS, 2008.

SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. **Boletim SBCTA**, v. 32, p. 105 1998.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Bioactive peptides. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 4, pp. 914–931, 2008.

SHAHIDI, F.; XIAO-QING, H.; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, n. 53, 285–293, 1995.

SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Functional properties of bovine plasma intended for use as a functional ingredient in human food. **Food Sci. Technol.**, v. 37, n. 6, p. 709-718, 2003.

SIMPSON, B.K.; NAYERI, G.; YAYLAYANA, V.; ASHIEB, I.N.A. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat, **Food Chemistry**, v. 61, n. 1/2, pp. 131-138, 1998.

SINGH, J.; BATRA, N.; SOBTI, R.C. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* sp. SSR1. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 781-785, 2001.

SLIZYTE, R.; DAUKSAS, E.; FALCH, E.; STORRO, I.; RUSTAD, T. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by products. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 3-4, p. 1415-1424, 2005.

SOARES, L. H. B.; MARQUES, D. N.; ALBUQUERQUE, P. M.; AYUB, M. A. Z. Influence of some commercial proteases and enzymatic associations on the hydrolytic solubilization of deboned poultry meat proteins. **Food Science and Technology International**, London, v. 6, n. 4, p. 301-306, 2000.

SPELLMAN, D.; McEVOY, E.; O'CUINN, G.; FITZGERALD, R. J. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: comparison of tnbs, opa and ph stat methods for quantification of degree of hydrolysis. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, n. 6, p. 447-453, 2003.

STANLEY, D.W. Non-bitter protein hydrolysates. **Journal of the Canadian Institute Food Science Technology**, Ontario, v. 14, n. 1, pp. 49-52, jan. 1981.

SURÓWKA, K.; FIK, M. Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. I. Application of pepsin to the production of protein hydrolysate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 65, n. 3, p. 289-296,

1994.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (TACO), NEPA–UNICAMP- 4. ed. rev. e ampl. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011.161p.

TAVARES, L. de P.; RIBEIRO, K. C. de S. Desenvolvimento da avicultura de corte brasileira e perspectivas frente à influenza aviária **Organizações Rurais & Agroindustriais**, Lavras, v. 9, n. 1, p. 79-88, 2007.

THIANSILAKUL, Y.; BENJAKUL, S.; SHAHIDI, F. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). **Food Chemistry**, n. 103, pp. 1385–1394, 2007.

TORRES-FUENTES, C.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J. Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. **Food Chemistry**, n. 129, pp. 485–490, 2011.

TRINDADE, M. A.; FELÍCIO, P. E.; CASTILHO, C. J. C. Mechanically separated meat of broilers breeder and white layer spent hens. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 61, n. 2, p. 234-239, 2004.

TRINDADE, M. A.; NUNES, T. P.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J.; FELICIO, P. E. Estabilidade oxidativa e microbiológica em carne de galinha mecanicamente separada e adicionada de antioxidantes durante período de armazenamento a -18 °C. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28, n.1 , pp. 160-168, 2008 .

TRINDADE, M.A.; CONTRERAS CASTILLO, C.J.; FELÍCIO, P.E, Mortadella sausage formulations with mechanically separated layer hen meatpreblended with antioxidants **Sci. Agric.**, Piracicaba, v. 63, n.3, p.240-245, may/jun, 2006..

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). **Relatório anual-2013**. São Paulo: UBABEF, 2013.

VIOQUE, J. ; SÁNCHEZ-VIOQUE, R.; CLEMENTE, A.; PEDROCHE, J. ; YUST, M. M.; MILLÁN, F. Péptidos bioactivos en proteínas de reserva. **Grasas y Aceites**, n. 51, pp. 361–365,2000.

WERGEDAHL, H.; LIASET, B.; GUDBRANDSEN, O. A.; LIED, E.; ESPE, M.; MUNA, Z.; MORK, S.; BERGE, R. K. Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-coa: cholesterol acyltransferase activity in liver of zucker rats. **J Nutr**, n. 134 , pp. 1320–1327,2004.

WEBSTER, J.D.; LEDWARD, D.A.; LAWRIE, R.A. Protein hydrolysates from meat industry by-products. **Meat Science**, pp. 7147-157. 1982.

WEIR, G. S. D. Protein Hydrolysates as flavourings in developmentin. **Food Protein**, Hudson, B. J. F., Ed.; Elsevier: London, U.K., v. 4, pp. 175-217, 1986.

WERGEDAHL, H.; LIASET, B.; GUDBRANDSEN, O. A.; LIED, E.; ESPE, M.; MUNA, Z. Fishprotein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion

of HDL cholesterol and lowers acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats. **Journal of Nutrition**, n. 134, pp. 1320–1327, 2004.

WILLIAMS, S.R. **Fundamentos de nutrição e dietoterapia**. Porto Alegre: Artmed Editora, 1997. 668p.

XIA, S. H.; WANG, Z.; XU, S. Y. Characteristics of *Bellamyia purificata* snail foot protein and enzymatic hydrolysates. **Food Chem.**, v.101, n. 3, pp. 101:1188-96, 2007.

ZAVAREZE, E.R.; SILVA, C.M.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNANDEZ, C. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, v.32, n.7, p.1739-1743, 2009.