

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;
Nelson 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 termostático 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, before use it was thawed under refrigeration and homogenized in a processor by 2

¹ Prof^a Assistente da Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC e Discente de Doutorado 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, UFSM, Santa Maria, RS. E-mail: ffranzen2@gmail.com

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

* Autor para correspondência

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 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; FELÍCO; CASTILHO, 2004, TRINDADE et al., 2008; PÜSSA 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; BENÍTEZ; 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 sulfidrílo, 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*, *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 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 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 termostatizado (Banho Ultratermostatizado 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 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 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 5,0-8,0 (BENÍTEZ; 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.

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.

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 (*Gadus morhua*) 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 (*Oreochromus niloticus*) 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%.

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.

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 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.

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 (*Paralanchurus brasiliensis*) e Perna-de-Moça (*Cynoscion*) e outro produzido com Camarão-rosa (*Penaeus brasiliensis* e *Penaeus pauliensis*)

submetidos 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. Enzymic hydrolysis of food proteins. *Elsevier applied science*. Barking: Elsevier Applied Science, 1986. 427 p.
- 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. Instrução Normativa nº 4 de 31 mar. 2000. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, DF, 05 abr. 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 (*Oreochromus 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: 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.
- PÛSSA, 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*. 1991. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 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.