



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO DE CARNE ESCURA DE ATUM (*Katsuwonus pelamis*)

LETICIA HARUMI ARASAKI
Engenheira de Alimentos

ORIENTADOR
Prof. Dr. MARCELO CRISTIANINI

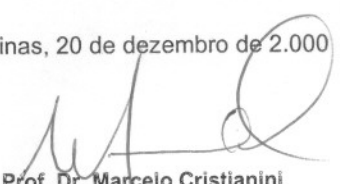
Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em
Tecnologia de Alimentos

Campinas, 2000
São Paulo- Brasil

PARECER

Este exemplar corresponde à redação
final da tese defendida por Leticia
Harumi Arasaki, aprovada pela
Comissão Julgadora em 20 de
dezembro de 2000.

Campinas, 20 de dezembro de 2.000


Prof. Dr. Marcelo Cristianini
Presidente da Banca



200101002

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	TI UNICAMP
	Ar15o
V.	Ex.
TOMBO BC/	43463
PROC.	16-392101
C	☐
D	☒
PREC	R\$14,00
DATA	28/01/01
N.º CPD	

CM-00154302-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

Ar15o Arasaki, Leticia Harumi
Otimização do processo de obtenção de hidrolisado protéico de carne escura de atum (*Katsuwonus pelamis*) / Leticia Harumi Arasaki. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Marcelo Cristianini
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

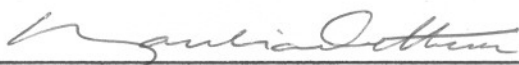
1.Pescado. 2.Atum. 3.Hidrolisado protéico. 4.Resíduos.
5.Enzimas proteolíticas. I.Cristianini, Marcelo. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcelo Cristianini

Orientador



Prof.ª. Dr.ª Marília Oetterer

Membro



Prof.ª. Dr.ª Flavia Maria Netto

Membro

Prof.ª. Dr.ª Maria Isabel Rodrigues

Membro

AGRADECIMENTOS

- ◆ Ao Prof. Marcelo por seu apoio, orientação, incentivo e amizade.
- ◆ À banca examinadora por suas valiosas sugestões.
- ◆ À minha família por seu enorme incentivo, amor e carinho.
- ◆ À Prof^{ra}. Flavia pelo auxílio e pelo uso dos laboratórios de Controle de Qualidade e Bioquímica Nutricional.
- ◆ À Prof^{ra}. Bel por sua ajuda nas análises estatísticas.
- ◆ Ao Prof. Satoshi pelo auxílio e pelo uso do Laboratório de Medidas Físicas.
- ◆ Ao Prof. Aloísio por suas sugestões e pelo uso do Laboratório de Funcionalidade de Proteínas.
- ◆ À Judite por sua ajuda, amizade e sugestões.
- ◆ À Eliana por seu apoio e auxílio nas diversas análises realizadas no DEPAN.
- ◆ Aos alunos de pós: Antônio (DEA) por sua ajuda na etapa de secagem; Daniel (DEA) por seu auxílio nas análises estatísticas e à Sônia (DEPAN) por sua ajuda no laboratório.
- ◆ Aos amigos Gisele, Ricardo, Susana, Maria Paula, Rodrigo, Gisele e Alexandre Urbano, pela amizade e sugestões.
- ◆ À Alcyon pelo fornecimento de matéria prima.
- ◆ Ao ITAL pela análise de aminoácidos.
- ◆ Ao CPQBA pela análise de Densitometria.
- ◆ À CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro.
- ◆ E a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	xix
ABSTRACT	xxiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo Geral	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Situação atual da produção e industrialização do pescado	4
3.2. Aproveitamento e formas de utilização de resíduos de pescado	5
3.3. Composição Química do Pescado	11
3.4. Propriedades Funcionais de Proteínas	11
3.4.1. Solubilidade	12
3.4.2. Capacidade de Retenção de Água	12
3.4.3. Capacidade de Formação de Emulsões	13
3.4.4. Capacidade de Formação de Espumas	13
3.5. Enzimas Proteolíticas	14
3.5.1. Considerações Gerais	14
3.5.2. Classificação	14
3.5.3. Propriedades	15
3.5.4. Proteases Microbianas	16
3.6. Hidrolisado Protéico de Pescado	17
3.6.1. Introdução	17
3.6.2. Obtenção	18
3.6.3. Propriedades	18
3.7. Utilização de Hidrolisados Protéicos	23
3.8. Metodologia de Superfície de Resposta	25

4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Material	27
4.1.1. <i>Pescado</i>	27
4.1.2. <i>Enzimas</i>	27
4.2. Métodos de Análises	27
4.2.1. <i>Determinação do pH</i>	27
4.2.2. <i>Determinação de Umidade</i>	28
4.2.3. <i>Determinação de Cinza</i>	28
4.2.4. <i>Determinação de Proteína</i>	28
4.2.5. <i>Determinação do Nitrogênio Não Protéico</i>	28
4.2.6. <i>Determinação de Lipídios Totais</i>	28
4.2.7. <i>Determinação de Grupo α-amino livre</i>	28
4.2.8. <i>Determinação do Valor TBA</i>	29
4.2.9. <i>Solubilidade</i>	29
4.2.10. <i>Determinação da Atividade Proteolítica</i>	29
4.2.11. <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida</i>	29
4.2.12. <i>Determinação de Aminoácidos</i>	30
4.2.13. <i>Avaliação do Grau de Hidrólise pelo método de pH-stat</i>	30
4.3. Preparo do Hidrolisado Protéico de Pescado	31
4.4. Testes Preliminares	32
4.4.1. <i>Procedimento de Hidrólise Enzimática</i>	32
4.4.2. <i>Influência da Temperatura no Grau de Hidrólise</i>	33
4.4.3. <i>Determinação do Tempo de Hidrólise</i>	33
4.5. Metodologia de Superfície de Resposta	34
4.5.1. <i>Planejamento Experimental 2^3 – Proteinase 1.5L</i>	34
4.5.2. <i>Planejamento Experimental 2^2 – Proteinase 1.5L</i>	34
4.5.3. <i>Planejamento Experimental 2^3 – Savinase®</i>	35
4.6. Secagem	36
4.6.1. <i>Secagem em Estufa</i>	36
4.6.2. <i>Secagem em Secador de Leito de Jorro</i>	36
4.7. Validação dos Modelos	37

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1. Caracterização da Matéria-prima	38
5.1.1. Composição Centesimal	38
5.1.2. Determinação do Valor TBA	38
5.2. Determinação das Atividades Proteolíticas	40
5.3. Resultados dos Testes Preliminares	41
5.3.1. Procedimento de Hidrólise Enzimática	41
5.3.2. Influência da Temperatura	43
5.3.3. Determinação do Tempo de Hidrólise	44
5.4. Hidrólise Enzimática	45
5.4.1. Planejamento Experimental 2 ³ – Proteinase 1.5L	45
5.4.2. Planejamento Experimental 2 ² – Proteinase 1.5L	48
5.4.3. Planejamento Experimental 2 ³ – Savinase®	53
5.4.4. Otimização dos Processos de Hidrólise	61
5.5. Validação dos Modelos	61
5.6. Caracterização dos Hidrolisados Protéicos	62
5.6.1. Composição Centesimal	62
5.6.2. Determinação do Valor TBA	64
5.6.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida	64
5.6.4. Solubilidade	66
5.6.5. Determinação de Aminoácidos	67
6. CONCLUSÕES	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
8. ANEXOS	83

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1: Parâmetros de hidrólise da carne escura de atum- Proteinase 1.5L	34
Tabela 4.2: Parâmetros de hidrólise da carne escura de atum- Proteinase 1.5L	35
Tabela 4.3: Parâmetros de hidrólise da carne escura de atum- Savinase®	35
Tabela 5.1: Composição centesimal e relação NNP/NT do atum*	38
Tabela 5.2: Planejamento Experimental 2^3 – Proteinase 1.5L	46
Tabela 5.3: Planejamento Experimental Fatorial Completo 2^2 – Proteinase 1.5L	48
Tabela 5.4: Tabela ANOVA – Proteinase 1.5L – Modelo Quadrático	51
Tabela 5.5: Planejamento Experimental 2^3 – Savinase®	53
Tabela 5.6: Tabela ANOVA –Savinase® - Modelo Quadrático	56
Tabela 5.7: Validação dos Modelos Matemáticos	62
Tabela 5.8: Composição centesimal e relação NNP/NT dos hidrolisados protéicos de atum*	62
Tabela 5.9: Malonaldeído dos Hidrolisados Protéicos de atum	64
Tabela 5.10: Solubilidade dos hidrolisados protéicos de atum	66
Tabela 5.11: Aminoácidos dos hidrolisados protéicos de carne escura de atum (g/100g de amostra seca)	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.1: Fluxograma de obtenção do Hidrolisado Protéico de Pescado	32
Figura 4.2: Esquema de um Secador de Leito de Jorro	36
Figura 5.1: Curva padrão para determinação do valor TBA	39
Figura 5.2: Curva padrão para determinação da atividade proteolítica, via tirosina formada	41
Figura 5.3: Nitrogênio Não Protéico nos três procedimentos para obtenção de hidrolisado protéico de carne escura de atum	42
Figura 5.4: Grupos α -amino livres nos três procedimentos para obtenção de hidrolisado protéico de carne escura de atum	42
Figura 5.5: Nitrogênio Não Protéico para as três temperaturas de hidrólise da carne escura de atum	43
Figura 5.6: Grupos α -amino livres para as três temperaturas de hidrólise da carne escura de atum	44
Figura 5.7: Hidrólise (DH%) da carne escura de atum, utilizando Proteinase 1.5L em pH 7, T 50°C e E/S 0,2%	45
Figura 5.8: Hidrólise (DH%) da carne escura de atum, utilizando Proteinase 1.5L – Planejamento Experimental 2 ³	46
Figura 5.9: Efeitos do pH, Temperatura, e relação E/S, na hidrólise enzimática de carne escura de atum, utilizando a enzima Proteinase 1.5L	47
Figura 5.10: Hidrólise (DH%) da carne escura de atum, utilizando Proteinase 1.5L – Planejamento Experimental 2 ²	49
Figura 5.11: Efeitos do pH e relação E/S na hidrólise de carne escura de atum utilizando Proteinase 1.5L (L=linear; Q=quadrático)	50

Figura 5.12: Superfície de Resposta (a) e Curvas de Contorno (b) para o estudo da influência do pH e da relação enzima substrato no grau de hidrólise com a enzima Proteinase 1.5L	52
Figura 5.13: Hidrólise (DH%) da carne escura de atum utilizando Savinase® – Planejamento Experimental 2 ³	54
Figura 5.14: Efeitos do pH, temperatura (T) e relação E/S na hidrólise de carne escura de atum utilizando Savinase® (L=linear; Q=quadrático)	55
Figura 5.15: Superfície de Resposta (a) e Curvas de Contorno (b) para o estudo da influência do pH e da temperatura no grau de hidrólise com a enzima Savinase®	57
Figura 5.16: Superfície de Resposta (a) e Curvas de Contorno (b) para o estudo da influência do pH e da relação E/S no grau de hidrólise com a enzima Savinase®	59
Figura 5.17: Superfície de Resposta (a) e Curvas de Contorno (b) para o estudo da influência da temperatura e da relação E/S no grau de hidrólise com a enzima Savinase®	60
Figura 5.18: Eletroforese em gel de poliacrilamida	65

RESUMO

Os resíduos da indústria pesqueira representam problemas ambientais e um desperdício significativo de um material com alto teor protéico. A carne escura de atum é descartada juntamente com outros tipos de resíduos, que incluem as vísceras, a cabeça, a cauda e os espinhos. A hidrólise enzimática de proteínas é uma alternativa para o reaproveitamento do resíduo e em alguns casos aumentar seu valor agregado, já que este processo pode melhorar algumas propriedades funcionais de proteínas.

O objetivo deste trabalho foi utilizar a Metodologia de Superfície de Resposta para estudar os efeitos do pH, temperatura e relação enzima/substrato no grau de hidrólise de carne escura de atum, utilizando as enzimas proteolíticas comerciais Proteinase 1.5L (Prozyn) e Savinase® (Novo Nordisk).

A carne escura de atum apresentou a seguinte composição centesimal: 64,63% de umidade, 26,88% de proteínas, 5,79% de lipídios e 1,85% de cinzas.

Utilizando-se a enzima Proteinase 1.5L, foi realizado um planejamento experimental 2^3 para estudar os efeitos das variáveis independentes pH, temperatura e relação enzima/substrato. Os intervalos estudados foram: pH de 6,75 a 7,25, temperatura de 40 a 60°C e relação enzima substrato de 0,1 a 0,3 %. Dentro das faixas estudadas, a variável de maior efeito no processo foi o pH, seguido da relação enzima/substrato. Observou-se que a temperatura não influenciou o processo significativamente ($p < 0,05$).

Foi então realizado um segundo planejamento experimental completo 2^2 para estudar os efeitos do pH e relação enzima/substrato no grau de hidrólise. Os intervalos estudados foram: pH de 6,6 a 7,4 e relação enzima substrato de 0,06 a 0,34 %. A variável de maior efeito no processo foi o pH. O processo foi

considerado como ótimo na região onde houve um maior grau de hidrólise, onde o pH variou de 6,6 a 6,7 e a relação enzima/substrato de 0,30 a 0,34%.

Para o estudo da obtenção do hidrolisado protéico utilizando a enzima Savinase® foi realizado um planejamento experimental completo 2^3 para avaliar os efeitos do pH, temperatura e relação enzima/substrato. Os intervalos estudados foram: pH de 8,5 a 9,5, temperatura de 36,6 a 53,4°C e relação enzima substrato de 0,03 a 0,37 %. Foi observado que as três variáveis dentro da faixa estudada influenciaram significativamente o processo. A variável de maior efeito no processo foi a relação enzima/substrato, seguida da temperatura e do pH. O processo foi considerado como ótimo na região onde houve um maior grau de hidrólise, onde o pH variou de 9,4 a 9,5, a temperatura de 52 a 53,4°C e a relação enzima/substrato de 0,28 a 0,37 %.

Foi obtido um modelo matemático para cada enzima estudada para descrever o processo de hidrólise nas regiões estudadas. Tais modelos foram validados comparando-se dados experimentais com resultados esperados pelo modelo. Foram obtidas superfícies de resposta que descrevem o processo nas regiões estudadas.

Dois métodos de secagem foram comparados para a obtenção do hidrolisado em pó: um utilizando um secador de jorro cônico e outro uma estufa com circulação forçada.

Comparando-se os hidrolisados produzidos com a Proteinase 1.5L, o produto seco em estufa apresentou uma solubilidade maior do que o seco em secador de jorro cônico. Para os hidrolisados produzidos com a Savinase®, o processo de secagem não influenciou significativamente na solubilidade dos produtos.

ABSTRACT

Fish processing wastes represent environmental problems and a meaningful waste of high protein material. Tuna dark meat is wasted as other kind of wastes, which include offal, head, tail and bones. Protein enzymatic hydrolysis is an alternative way to add value to by-products, as this process improves some of their functional properties.

The objective of this work was to study the effects of pH, temperature and enzyme/substrate ratio using Response Surface Methodology on the degree of hydrolysis of tuna dark meat using the commercial enzymes Proteinase 1.5L and Savinase®.

Tuna dark meat showed the following chemical composition: 64,63% moisture, 26,88% protein, 5,79% fat and 1,85% of ash.

Using the enzyme Proteinase 1.5L, an experimental design 2^3 was used to evaluate the effects of the independent variables pH, temperature and enzyme/substrate ratio on the degree of hydrolysis of tuna dark meat. The parameters studied were pH from 6,75 to 7,25, temperature from 40 to 60°C and enzyme/substrate ratio from 0,1 to 0,3%. The factor of highest effect on the reaction was the pH, followed by the enzyme/substrate ratio. It was observed that the temperature didn't influence the process significantly.

Therefore, a second experimental design 2^2 elaborated to study the effect of pH and enzyme/substrate ratio on the degree of hydrolysis. The parameters studied were pH 6,6 to 7,4 and enzyme/substrate ratio 0,06 to 0,34%. The factor of highest effect was the pH. The process was considered optimum in the region where there was a highest degree of hydrolysis, the pH varied from 6,6 to 6,7 and the enzyme/substrate ratio from 0,30 to 0,34%.

An experimental design 2^3 was used to evaluate the effects of the independent variables pH, temperature and enzyme/substrate ratio on the degree of hydrolysis of tuna dark meat using the enzyme Savinase®. The intervals studied were: pH 8,5 to 9,5, temperature 36,6 to 53,4°C and enzyme/substrate ratio from 0,03 to 0,37. It was observed that the three factors influenced the process significantly. The factor of highest effect on the reaction was the enzyme/substrate ratio. The process was considered optimum in the region where there was a highest degree of hydrolysis, where the pH varied from 9,4 to 9,5, the temperature from 52 to 53,4°C and enzyme/substrate ratio from 0,28 to 0,37%.

A mathematical model was obtained for each enzyme to describe the hydrolysis reaction in the studied areas. Such models were considered predictive in the region studied.

Two drying methods to obtain a dried product were compared: fluidized bed and conventional oven. Comparing the protein hydrolysates produced with Proteinase 1.5L, the sample dried in the oven showed higher solubility than the one dried in the fluidized bed. For the protein hydrolysate obtained with Savinase®, the drying method did not influence significantly the product solubility.

1. INTRODUÇÃO

Os resíduos das indústrias processadoras de pescado representam sérios problemas de sanidade das instalações e interferem nos custos e na eficiência de produção (VALÉRIO, 1994).

De acordo com WINDSOR & BARLOW (1984), um terço do total da captura mundial de pescado não é empregada para o consumo direto na alimentação humana e sim para a elaboração de subprodutos.

A bioconversão de resíduos tem sido a maneira mais natural de se retornar ao meio ambiente, os recursos anteriormente extraídos dele. Espera-se que o desenvolvimento da biotecnologia facilite o avanço dos processos de reciclagem natural, os quais se farão necessários para acompanhar os níveis de densidade populacional, no presente e no futuro, assim como o aumento da demanda (MARTIN & PATEL, 1991).

Sabendo-se que a pesca tem sido baseada unicamente na obtenção de produtos destinados a alimentação humana, os subprodutos exercem um papel importante a ser julgado. As espécies de melhor aproveitamento produzem aproximadamente 50% de materiais comestíveis na forma de filés de pescado. O resíduo, constituído de cabeça, esqueleto, vísceras, possui um conteúdo de proteína quase tão elevado quanto o próprio filé (WINDSOR & BARLOW, 1984). Esses resíduos podem ser aproveitados, descartados total ou parcialmente, e ainda modificados previamente, de forma a não se constituírem poluentes. Certamente que esta orientação será decidida por diferentes fatores, inclusive os de ordem econômica (GREEN & MATTICK, 1977).

Nos Estados Unidos, os resíduos sólidos da indústria pesqueira chegam a 6 mil toneladas, sendo aproveitados 50% para a alimentação animal (REBECA et alii., 1991).

Em países tropicais, grande quantidade de pescado é perdida, especialmente na pesca de pequeno porte. É de suma importância o desenvolvimento de novas tecnologias com vistas à utilização destes peixes, preferencialmente em alimentação humana. Há registro de pesquisas conduzidas com este objetivo, mas, enquanto o fato não se efetiva, o caminho mais curto seria reverter estas perdas, transformando os resíduos em alimentação animal. O hidrolisado de pescado vem a representar uma alternativa bastante atraente para utilização desses resíduos (DISNEY & HOFFMAN, 1978).

No Brasil, o aproveitamento de resíduos de pescado é pouco significativa. Apenas na indústria de conservas, estes resíduos são utilizados para a elaboração de farinha de pescado de baixa qualidade (MORALES-ULLOA, 1994).

A produção de um hidrolisado protéico de pescado, além de minimizar os problemas com os resíduos, pode servir como uma nova fonte protéica para a incorporação em alimentos e rações animais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar uma alternativa para o aproveitamento do resíduo de pescado (carne escura de atum), evitando desperdício de material protéico e aumentando a receita das unidades processadoras.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Elaborar hidrolisados protéicos de resíduos de atum (carne escura de *Katsuwonus pelamis*) utilizando duas enzimas proteolíticas comerciais: Proteinase 1.5L (Prozyn) e Savinase® (Novo Nordisk).
- b) Estudar o efeito da temperatura, pH e concentração de enzima na hidrólise enzimática.
- c) Otimizar o processo de obtenção de um hidrolisado protéico de carne escura de atum (*Katsuwonus pelamis*).
- d) Comparar a secagem em secador de leito de jorro cônico com a secagem em estufa com circulação forçada quanto ao efeito na solubilidade do hidrolisado protéico.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Situação atual da produção e industrialização do pescado

O total mundial de pescado capturado atualmente é de cerca de 90 milhões de toneladas, sendo aproximadamente 60% utilizados para o consumo humano e destes, aproximadamente 30% na forma de congelados. Apesar da larga distribuição de pescado na forma refrigerada e congelada, 20% do total capturado segue para as linhas de salga e secagem, de defumação e enlatamento (OETTERER, 1993/94).

O Brasil, quando comparado com outros países da América Latina, tem sido ultrapassado nos últimos anos, em termos de produção, e constitui um dos grandes importadores de pescado no mercado mundial (MACEDO, 1993). Os recursos marinhos capturados ainda são limitados, com predominância de sardinha, atum, cação, corvina, camarão e lagosta (TEIXEIRA, 1993).

O parque industrial brasileiro se desenvolveu ao longo do litoral, principalmente nas regiões sul e sudeste, absorvendo cerca de 60% da produção. A indústria produz, para o consumo direto, o pescado resfriado, o pescado congelado inteiro, eviscerado, em filé e em postas; para o consumo de pescado processado, o salgado, prensado, defumado e seco e o pescado enlatado. Além disso, produz ainda farinha e óleo de peixe (OETTERER, 1993/94).

A indústria de conservas de pescado fatura hoje, cerca de US\$ 150 milhões por ano. O Brasil produziu em média nos últimos anos, cerca de 45 milhões de latas de atum (SANTOS, 1994, citado por CRISTIANINI, 1998).

O mercado de atum em conserva estimado para o Brasil para o ano 2000 é de 3084 toneladas (BRAZIL TREND'99, 1999). A quantidade de carne vermelha estimada é de 631 toneladas.

3.2. Aproveitamento e formas de utilização de resíduos de pescado

Os resíduos de pescado, junto aos postos de beneficiamento e comercialização, causam sérios problemas de poluição ambiental, pois nem sempre é economicamente viável o transporte dos mesmos para as fábricas de processamento de subprodutos (NUNES, 1992).

O aproveitamento integral dos resíduos da indústria pesqueira, sejam sobras comestíveis da operação de filetagem, das carnes vermelhas provenientes do processamento de atum ou das sobras de sardinhas que excedem o tamanho da lata, minimizariam os problemas de poluição ambiental e permitiriam o aparecimento de novos produtos, levando a uma redução dos custos de produção. (MORALES-ULLOA, 1994).

O termo resíduo diz respeito a todos os subprodutos e sobras do processamento de alimentos, de valor econômico relativamente baixo. No caso do pescado, o material residual pode se constituir de aparas na fase de "toalete" do filetamento e anterior ao enlatamento, carne escura, camarões fora do tamanho para descasque manual ou mecânico, cabeças, carcaças, e efluentes em geral. Pesquisas vêm sendo feitas para o preparo da polpa de pescado com estes resíduos (LISTON, 1977; MORAIS & MARTINS, 1981).

A necessidade de se montar sistemas de aproveitamento dos resíduos nas indústrias é de ordem econômica e preservacionista, em termos de conservação de energia. Pode-se pensar desde um maior uso da matéria-prima até o produto final, ou ainda, no desenvolvimento de novos produtos mediante a utilização de resíduos (MAIA, Jr., 1998).

Nas indústrias processadoras de pescado, além dos problemas de sanidade para as instalações, a questão do aproveitamento de resíduos vem a afetar diretamente o custo energético e a eficiência da produção. A conversão do material residual não utilizado em produtos comerciais, permite solucionar grande

parte destes problemas, podendo levar, também, ao desenvolvimento de novos produtos a serem obtidos pela recuperação da proteína e outros nutrientes, ou ainda, constituintes que poderão ser utilizados como ingredientes alimentícios, mantendo o aroma dos frutos do mar (HOOD & ZALL, 1979).

Os conceitos e razões que direcionam as idéias para utilização dos resíduos são vários, muitas vezes têm vida curta, e freqüentemente são tidos como desperdício de investimento. Não raro, os aspectos científicos e tecnológicos são preteridos por razões de ordem econômica e política. O ideal seria utilizar a matéria-prima em toda sua extensão, e recuperar os subprodutos, evitando a própria formação do resíduo (MAIA, Jr., 1998).

Para BIMBO & CROWTHER (1992), apenas 28% da produção mundial de pescado e moluscos, da ordem de 100 milhões de toneladas por ano, são processados como alimento e óleo. Os autores ressaltam que pressões de natureza econômica sobre as regiões mais pobres, ocorrência de preços baixos nas regiões tradicionalmente produtoras e o alto custo dos combustíveis, têm impulsionado a indústria na busca de novos mercados e produtos que possam tirar vantagem dos conteúdos protéicos e do teor de gordura do pescado.

Nos Estados Unidos, para a produção de atum enlatado, as vísceras são removidas e usadas para o preparo de rações, e o fígado é usado como fonte de óleo e de vitaminas. A carne escura é separada e utilizada para ração. O mesmo ocorre no caso do salmão (*Oncorhynchus sp.*) (JONES, 1974).

As indústrias produtoras de atum enlatado produzem quantidades significativas de efluentes sendo que o rendimento do processamento é de aproximadamente 40%. Tais resíduos têm componentes de importância econômica, como óleo, proteína e minerais. Esta situação gerou interesse no aproveitamento de resíduos havendo a criação de novos produtos (SUBASINGHE, 1996).

Grande parte da tecnologia conhecida para a utilização dos resíduos das

indústrias de pescado não se mostra economicamente atrativa, em vista do elevado investimento inicial. Os aterros sanitários e lagoas de tratamento de efluentes não são alternativas recomendáveis, devido ao odor desagradável que provocam nas áreas costeiras ou de águas doce, quase sempre exploradas como pólos de lazer (LUSTOSA NETO, 1994).

A farinha de pescado constitui uma boa forma de aproveitamento de resíduos, porém o peso dos investimentos em tecnologia e combustíveis é bastante significativo. Em termos quantitativos, o volume de resíduos sólidos gerados pelas indústrias processadoras de pescado, à exceção das produtoras de farinha, oscila entre 30 a 80% do volume de desembarque, de acordo com o sistema de produção (MAIA, Jr., 1998).

ESPÍNDOLA FILHO et alii (2000a) enfatizam que o aproveitamento integral do pescado e dos recursos marinhos poderá prevenir a degradação ambiental e o prejuízo econômico, além de combater a fome e gerar empregos diretos e indiretos no setor do agronegócio.

Dentre as diferentes formas de recuperação e utilização de resíduos do pescado podem ser citadas as seguintes (GREEN & MATTICK, 1977):

- Produção de iscas;
- Ração para animais domesticados: resíduos de atum e salmão, a “fauna acompanhante” e espécies de baixo valor comercial são usados para elaboração de alimentos enlatados para gatos;
- Farinha de pescado e de crustáceos: as indústrias de farinha de pescado são empreendimentos de grande porte, consolidados e com importante participação no mercado internacional, apresentando baixa margem de rentabilidade. Desta maneira, torna-se praticamente impossível para uma indústria de pescado produzir farinha a partir de seus próprios resíduos, com alguma rentabilidade.

- Quitina e quitosanos: quitina é um polissacarídeo composto de poli-N-acetil-D-glucosamina e o quitosano é o derivado desacetilado da quitina. Sua principal aplicação é na floculação de resíduos sólidos da indústria de alimentos, e a produção requer investimento inicial alto.
- Silagem de pescado: também chamado de pescado liqüefeito, é o produto resultante da autólise de pescado inteiro triturado ou de resíduos, mantidos sob determinadas condições de acidez. O processo é relativamente simples, sendo necessário apenas a trituração do material, adição de ácidos (fórmico, propiônico, sulfúrico) ou enzimas e um recipiente para misturar. O investimento de capital é mínimo; podendo ser realizado em pequena ou grande escala. O produto final é hidrolisado, com solubilidade de 60 a 80%. A fração lipídica por aquecimento pode ser extraída entre 60 e 70° C, com posterior decantação ou centrifugação. Pode ser utilizado como alimento líquido para porcos, gado e aves, e, uma vez seco, resiste a estocagem por tempo prolongado, para utilização em rações para animais.
- Compostagem aeróbica: trata-se de um processo de baixo custo, apropriado para grandes e pequenos volumes de material residual. O tempo de processo está na faixa de 1 a 2 semanas, resultando um produto estável e inodoro. Na presença de carboidratos, acelera-se a degradação. As pilhas devem ser viradas freqüentemente para permitir a oxigenação do material e reduzir odores. Observa-se uma redução de 20 a 40% do conteúdo de sólidos, na medida em que o carbono é convertido, para formação do gás carbônico. O conteúdo de nitrogênio e cinzas cresce com a matéria seca. Adubos obtidos de carne de pescado têm alto teor de nitrogênio, sendo adequados para fertilização. A compostagem aeróbica também pode ser usada na alimentação animal.
- Compostagem para cogumelos;
- Compostagem anaeróbica;

- Proteína de unicelulares: produção de proteína de organismos unicelulares alimentados com óleos ou resíduos do pescado.
- Recuperação de fragmentos comestíveis: utiliza desossadores mecânicos para recuperação de tecidos musculares aproveitáveis do pescado. Estas máquinas recuperam 55 a 65% do tecido muscular, contra os 40 a 42% da filetagem. Utilizado em embutidos e surimi. As águas de lavagens de ostras e outros bivalvos podem ser recuperadas para produção de sabores e extratos.
- Fertilizantes;
- Óleos de pescado: têm seu uso na fabricação de margarinas e óleos de cozinha, atuando como fonte de vitaminas e de ácidos graxos poliinsaturados da série ômega 3, com propriedades terapêuticas e profiláticas.
- Hidrolisados de pescado: são utilizados para a modificação de propriedades funcionais de alimentos e como fonte de pequenos peptídeos e aminoácidos (VENUGOPAL, 1994).

ROCHA (2000) cita outras opções de aproveitamento integral do pescado na Região Nordeste do Brasil:

- Produção de cápsulas de cartilagem de tubarão, pó de casca de ostra e óleo de peixe, com fins nutricionais (complemento de cálcio e/ou vitaminas lipossolúveis) e terapêuticos.
- Utilização de exoesqueletos, peles, conchas, algas, em composições decorativas e artesanato.
- Utilização de peles de pescado em artigos de indumentária e adornos.
- Utilização de cabeças e ossos com resíduos de filetagem, na produção de patê.

ESPÍNDOLA FILHO et alii (2000b) produziram um biofertilizante marinho, a partir da silagem ácida de resíduos de pescado incorporada ao pó de ostras, que apresentou um efeito positivo na produção de hortaliças, quando cultivadas em solo de baixa fertilidade, para a utilização como alimento orgânico.

LUSTOSA NETO (1994) elaborou um ensilado biológico de resíduos de pescado da família *Lutjanidae*, concluiu que o processo de obtenção é tecnicamente viável e sugeriu o uso do produto como suplemento protéico em rações para animais.

McCOMIS & LITCHFIELD (1985) citaram algumas formas de processamento de resíduos da indústria pesqueira, como o tratamento enzimático da água industrial em tanques e a recuperação de óleo. Nos processos houve uma diminuição da demanda biológica de oxigênio (DBO).

Diversos processos para a modificação de resíduos de pescados, que são descartados ou utilizados para a obtenção de produtos de baixo valor comercial, vêm sendo desenvolvidos para um melhor aproveitamento e recuperação, com um maior valor agregado (PIGOTT, 1982).

No caso da produção de alimentos, o sucesso para a agregação de valor aos recursos de baixo valor comercial depende da aplicação cuidadosa de técnicas, nas quais as propriedades iniciais são mascaradas, ou modificadas para alcançar o desejo do consumidor (VENOGUPAL, 1995).

No Brasil, existe a necessidade do aproveitamento integral do pescado, sabendo-se que o volume significativo de resíduos gerados, tanto pelo processamento, como pela presença, na captura, de espécies de fauna acompanhante, pode ser transformado em produtos com valor agregado. O aproveitamento de resíduos traria não somente benefícios econômicos, mas também ambientais.

3.3. Composição Química do Pescado

Segundo SUZUKI (1981) a composição do músculo de pescado é 68-84% de água, 15-24% de proteínas, 0,1-22% de lipídios, 0,8-2% de substâncias inorgânicas e 1-3% de carboidratos.

Segundo CONTRERAS-GUZMAN (1994), a carne escura de atum possui 69,2-71,3% de umidade, 21,0-23,0% de proteína, 5,54-6,86% de gordura e 1,19-1,20% de cinza.

STANSBY (1962) classificou e dividiu o pescado nas seguintes categorias:

- A: baixo teor de gordura (<5%) e alto teor protéico (15-20%);
- B: médio teor de gordura (5-15%) e alto teor protéico (15-20%);
- C: alto teor de gordura (>15%) e baixo teor protéico (<15%);
- D: baixo teor de gordura (<5%) e teor protéico muito alto (>20%);
- E: baixo teor de gordura (<5%) e baixo teor protéico (<15%).

3.4. Propriedades Funcionais de Proteínas

Segundo CÂNDIDO (1998), propriedade funcional é uma propriedade físico-química, que afeta o processamento e o comportamento de proteínas, em um sistema alimentar, julgada pelos atributos de qualidade do produto final.

A avaliação das propriedades funcionais das proteínas é necessária e ajuda os produtores de alimentos a selecionar a proteína certa, para uma dada aplicação e definir como a proteína ou derivado, pode substituir outras proteínas nas formulações de alimentos (QUAGLIA & ORBAN, 1990).

Vários requisitos devem ser preenchidos para que as proteínas possam ser utilizadas em alimentos novos ou em imitações de alimentos já existentes. As propriedades funcionais estão relacionadas com o comportamento físico das proteínas em alimentos e refletem interações que são influenciadas pela

composição da proteína: sua estrutura e conformação, associações intra e intermoleculares da proteína com outros componentes do alimento e a natureza do meio em que estas reações podem ocorrer (KINSELLA, 1979).

Produzido sob uma proteólise controlada, o hidrolisado protéico de pescado possui propriedades funcionais desejáveis e alto valor nutritivo (QUAGLIA & ORBAN, 1987a; REBECA et alii., 1991).

3.4.1. Solubilidade

A solubilidade é uma propriedade física e também funcional muito importante, pois influi em outras propriedades funcionais em graus diferentes (SGARBIERI, 1998).

Os produtos protéicos devem possuir uma alta solubilidade, que depende do estado físico-químico de suas moléculas de proteínas, as quais podem ser favoravelmente ou adversamente afetadas pelo aquecimento, secagem e outros tratamentos durante sua manufatura e armazenamento (MORR et alii, 1985).

A solubilidade é afetada por uma série de fatores: fonte de proteína, histórico de processamento, aquecimento, pH, força iônica ou concentração de sais, temperatura e natureza do solvente, concentração protéica e a presença de outros ingredientes (KINSELLA, 1976; SGARBIERI, 1998).

DINIZ & MARTIN (1997) verificaram que com o aumento do grau de hidrólise de um hidrolisado protéico de músculo de tubarão, houve também um aumento em sua solubilidade. QUAGLIA & ORBAN (1987a,b) observaram o mesmo efeito da extensão da hidrólise na solubilidade do hidrolisado protéico de sardinha.

3.4.2. Capacidade de Retenção de Água

A capacidade de retenção de água descreve a habilidade do músculo para reter água sob uma série de condições específicas. A capacidade de retenção de

água de um produto pode influenciar suas propriedades sensoriais como textura e sabor (TROUT, 1988).

A capacidade de retenção de água está relacionada com a viscosidade e é influenciada pelo pH, força iônica e temperatura (KINSELLA, 1979).

A capacidade de retenção de água do hidrolisado protéico de músculo de tubarão foi influenciada negativamente pela extensão da hidrólise (DINIZ & MARTIN, 1997).

3.4.3. Capacidade de Formação de Emulsões

A habilidade da proteína a formar emulsões é importante para muitas aplicações em alimentos, como maioneses, molhos para salada e embutidos. Depende do pH e da força iônica (KINSELLA, 1976).

DINIZ & MARTIN (1997) reportaram que a capacidade de formação de emulsões do hidrolisado protéico de músculo de tubarão diminuiu significativamente com o aumento do grau de hidrólise.

VIEIRA et alii (1995a) compararam a capacidade de emulsificação de hidrolisados protéicos de resíduos de lagosta, elaborados com uso de três enzimas: papaína, pepsina e protease fúngica. O produto que apresentou uma maior capacidade de formação de emulsões foi o obtido com protease fúngica.

3.4.4. Capacidade de Formação de Espumas

A capacidade de formação de espuma é uma propriedade funcional importante na produção de vários alimentos. É medida pelo aumento de volume de uma dispersão de proteína como resultado da incorporação de ar por, batimento, agitação ou aeração. A estabilidade de uma espuma está relacionada com sua capacidade de manter seu volume máximo durante certo intervalo de tempo (SATHE & SALUNKE, 1981).

Os fatores que influenciam a capacidade de formação de espumas são: tipo de proteína, pH, concentração, temperatura e tempo de aquecimento, solubilidade e método de preparo (KINSELLA, 1976).

A capacidade de formação de espumas diminuiu com o aumento do grau de hidrólise do hidrolisado protéico de músculo de tubarão (DINIZ & MARTIN, 1997).

3.5. Enzimas Proteolíticas

3.5.1. Considerações Gerais

A classificação internacional das enzimas foi feita baseada nas reações por elas catalisadas. Existem seis grandes classes: 1-oxirredutases, 2-tranferases, 3-hidrolases, 4-liases, 5-isomerases e 6-ligases. Cada uma das classes é dividida em sub-classes (LEHNINGER, 1984). De acordo com a União Internacional de Bioquímica (IUB), cada enzima é denominada baseando-se num sistema de quatro números, separados por pontos e dispostos com o seguinte princípio: o primeiro especifica a classe, o segundo a sub-classe e especifica o substrato ou a ligação sobre a qual a enzima atua, o terceiro define a atividade enzimática e o quarto é o número de série da enzima (CÂNDIDO, 1998).

As enzimas proteolíticas são hidrolases que atuam sobre proteínas. São utilizadas para a produção de diversos alimentos, como queijos, cereais, cacau, carnes e pescado, cervejas e hidrolisados protéicos (WHITAKER, 1994; OUTTRUP & BOYCE, 1990).

3.5.2. Classificação

As enzimas proteolíticas são classificadas em quatro grupos: proteases contendo serina, contendo cisteína, metaloproteases e proteases aspárticas (NEURATH, 1989; WHITAKER, 1994). As enzimas podem ser divididas em exoproteases e endoproteases, dependendo do local da atuação. As exoproteases hidrolisam a proteína nas extremidades N-terminais (aminopeptidases) ou C-terminais (carboxipeptidases). Por outro lado, as endoproteases agem na

molécula de proteína longe das extremidades (ADLER-NISSEN, 1986; LÖFFLER, 1986; VENUGOPAL, 1994).

As proteases contendo serina incluem a família das quimotripsinas, a tripsina, a elastase, a protrombina, a subtilisina e a protease α -lítica de *Sorangium* sp (WHITAKER, 1994). Têm aplicação na produção de detergentes e as subtilisinas de *Bacillus amyloliquefaciens* e de *Bacillus licheniformis* foram as primeiras enzimas produzidas em escala industrial (OUTTRUP & BOYCE, 1990).

As proteases contendo cisteína hidrolisam as ligações peptídicas de proteínas e são inibidas por reagentes do grupo sulfidril. Este grupo inclui enzimas de fonte vegetal (papaína, bromelina e ficina), de fonte microbiana (WHITAKER, 1994) e a de fonte animal (catepsina) (PÓLGAR, 1989).

Os grupos carboxila dos dois resíduos de ácido aspártico são os grupos catalíticos nos sítios ativos das proteases aspárticas. Entre as principais enzimas deste grupo estão a renina e a pepsina (WHITAKER, 1994). Ao contrário das proteases contendo serina, as proteases aspárticas apresentam um alto grau de especificidade de substrato, o que significa que possuem baixo grau de atividade proteolítica na maioria das proteínas (OUTTRUP & BOYCE, 1990).

As maioria das metaloproteases contém zinco (PÓLGAR, 1989; OUTTRUP & BOYCE, 1990), mas em alguns casos a enzima pode apresentar um outro metal (DUNN, 1989). As metaloproteases incluem as carboxipeptidases A e B, dipeptidases, aminopeptidases, prolidase e iminopeptidase (WHITAKER, 1994).

3.5.3. Propriedades

A hidrólise enzimática possui vantagens sobre os métodos de hidrólise ácida ou alcalina. As principais vantagens do uso de enzimas são:

- As proteases têm especificidade única, evitando reações paralelas (LÖFFLER, 1986) e controlando as características finais do produto (DINIZ & MARTIN, 1999);

- A digestão ocorre sob condições amenas de pH e temperatura (DINIZ & MARTIN, 1999; GILDBERG, 1993; LÖFFLER, 1986);
- As enzimas possuem uma atividade catalítica extremamente alta, necessitando menos energia do que qualquer tratamento químico ou físico (LÖFFLER, 1986);
- A taxa de hidrólise é controlada através da inativação enzimática por aquecimento;
- As propriedades funcionais atrativas do hidrolisado protéico;
- Não há destruição de aminoácidos, assim a proteína mantém seu valor nutritivo (DINIZ & MARTIN, 1999).

Por outro lado, também existem desvantagens no uso de enzimas proteolíticas, entre elas, LÖFFLER (1986) cita:

- A maioria das proteases não é suficientemente estável ou ativa sob as condições de pH, temperatura, e concentração de substrato normalmente presentes em sistemas de alimentos.
- As proteases não são normalmente reutilizadas devido a sua dificuldade de separação dos substratos e dos produtos após o uso.

3.5.4. *Proteases Microbianas*

As proteases microbianas podem ser extracelulares ou intracelulares. As enzimas extracelulares são aquelas produzidas por organismos e englobam a maioria das enzimas hidrolíticas incluindo as proteases. Alguns microrganismos secretam uma variedade de proteases, cujas quantidades dependem da composição nutricional do meio e das condições de crescimento (VENUGOPAL, 1994).

As enzimas microbianas são produzidas por métodos baratos e fáceis. Os microrganismos têm um curto tempo de duplicação, o que permite que eles sejam facilmente ajustados à demanda do mercado. Além disso, condições ambientais podem ser monitoradas para que tenham consistência com a pureza, estabilidade e atividade da enzima. Finalmente, os microrganismos exibem uma mais ampla variedade de proteases específicas do que plantas ou animais (LÖFFLER, 1986).

É importante ressaltar que os microrganismos utilizados devem ser seguros para aplicações em alimentos (VENUGOPAL, 1994).

A escolha da enzima tem grande importância na produção de hidrolisados protéicos de pescado, sendo o uso de proteases microbianas bastante recomendável para dar origem a produtos com boas propriedades funcionais e nutricionais.

3.6. Hidrolisado Protéico de Pescado

3.6.1. Introdução

Hidrolisados protéicos são preparados por uma degradação mais ou menos profunda de moléculas de proteína em peptídios menores e eventualmente em aminoácidos. Esta degradação é catalisada por ácido, base ou enzimas, chamadas de proteases (ADLER-NISSEN, 1986).

Os hidrolisados protéicos possuem várias propriedades funcionais, sendo atrativos na nutrição humana, tanto para a obtenção de produtos com fins especiais como para produtos mais genéricos (FROKJAER, 1994). Os hidrolisados protéicos de pescado são produzidos pela digestão da carne de pescado por enzimas proteolíticas de fontes vegetais e animais (VENUGOPAL, 1994).

Entre os processos de aproveitamento de resíduos de pescado, a produção de hidrolisados tem a vantagem adicional do processo poder ser realizado durante todo o ano e o material pode ser armazenado, sem liberar odores desagradáveis (REGENSTEIN, 1991).

3.6.2. Obtenção

A hidrólise enzimática do pescado é um método alternativo que objetiva a recuperação de espécies sub-utilizadas, que seriam desperdiçadas ou usadas para ração animal, ou ainda como fertilizante. Neste processo, enzimas proteolíticas são empregadas para solubilizar a proteína do pescado, resultando na separação de duas frações: insolúvel e solúvel; a primeira pode ser usada como ração animal e a segunda, contendo a proteína hidrolisada, pode ser convertida em um ingrediente a ser incorporado em alimentos para consumo humano (DINIZ & MARTIN, 1999).

Na produção de hidrolisados protéicos utilizados para o aumento do valor nutricional, freqüentemente uma mistura de endo e exopeptidases é usada (LAHL & BRAUN, 1994).

3.6.3. Propriedades

O hidrolisado protéico de pescado se distingue dos alimentos fermentados por sua alta solubilidade em água, baixos teores de gordura e cinzas e também pelo seu alto teor protéico. O produto pode ser obtido por métodos convencionais de digestão proteolítica de peixes e resíduos de peixes, em condições ótimas de pH e temperatura, requeridos pelas enzimas. A liquefação ocorre em poucas horas. O hidrolisado é , então, decantado e centrifugado para remoção de escamas e espinhos. A fração solúvel é concentrada (VENUGOPAL, 1994).

A avaliação das propriedades funcionais de produtos protéicos é necessária e ajuda os produtores de alimentos a selecionarem a proteína certa, para cada aplicação, ou definir como uma proteína ou derivado pode substituir outras proteínas, em formulações de alimentos (QUAGLIA & ORBAN, 1990).

Pela seleção da enzima e das condições de digestão, diversos graus de hidrólise ou quebra de proteínas podem ser obtidos para dar origem a produtos com uma ampla faixa de propriedades funcionais. Uma proteólise não controlada ou prolongada resulta na formação de peptídeos menores altamente solúveis, completamente sem as propriedades funcionais das proteínas nativas, como capacidade de retenção de água, emulsificação e formação de espuma. Com um controle cuidadoso da hidrólise, pode-se modificar as propriedades funcionais, que são úteis na formulação de alimentos (MACKIE, 1982).

DINIZ e MARTIN (1997) estudaram o efeito da extensão da hidrólise enzimática nas propriedades funcionais do hidrolisado protéico de tubarão (*Squalus acanthias*). Foram estudadas a solubilidade, a capacidade de retenção de água e óleo, além da capacidade de formação de espuma. Os autores sugeriram que o produto tem potencial para ser usado como ingrediente alimentar e que a extensão da hidrólise deve ser determinada pela aplicação desejada, já que o tratamento enzimático pode causar mudanças substanciais na funcionalidade das proteínas.

CÂNDIDO (1998) estudou as propriedades funcionais e nutricionais de concentrados e hidrolisados protéicos de tilápia do Nilo (*Oreochromus niloticus*). A hidrólise enzimática teve um efeito marcante na melhora das propriedades funcionais do concentrado protéico. As enzimas utilizadas foram a alcalase e a flavourzyme.

HALE (1969) examinou a hidrólise de proteínas de resíduos da filetagem de pescado utilizando 23 enzimas proteolíticas comerciais. Os testes foram realizados por 24 horas nas condições ótimas de cada enzima. A enzima que apresentou a maior atividade foi a Pronase, uma protease fúngica de

Sterptomyces griseus, porém é um produto de custo elevado. O hidrolisado apresentou alta solubilidade e um balanço de aminoácidos excelente. Combinando o custo com a atividade, concluiu que a pancreatina, a papaína e a pepsina seriam adequadas para o processo.

QUAGLIA & ORBAN (1987a) estudaram a hidrólise enzimática de sardinha (*Sardinella sp*) utilizando alcalase, papaína e neutrase e concluíram que as duas primeiras foram melhores em termos de recuperação de nitrogênio para a produção de hidrolisados com alto teor protéico, valor nutricional e solubilidade. Além disso, testaram a influência do grau de hidrólise na solubilidade de hidrolisados protéicos de sardinha, utilizando a Alcalase e obtiveram produtos altamente solúveis, mas com uma redução de solubilidade acentuada nos hidrolisados com menor grau de hidrólise (QUAGLIA & ORBAN, 1987b).

Resíduos da produção de surimi feitos de merluza (*Merluccius productus*) foram utilizados para a produção de um hidrolisado protéico, utilizando-se as enzimas alcalase e neutrase. A enzima que apresentou a maior atividade foi a alcalase e suas condições ótimas de processamento foram relação enzima substrato de 20 AU/kg, tempo de reação de 1 hora e proporção resíduo/tampão 1:1. Os produtos apresentaram alto teor protéico e composição de aminoácidos comparável ao músculo de peixe (BENJAKUL & MORRISEY, 1997)

VENUGOPAL & LEWIS (1981) produziram hidrolisados protéicos de pescado de baixo valor comercial utilizando enzimas, ácido e álcali. Obtiveram uma máxima solubilização usando pepsina. Além disso, também fizeram uma desodorização parcial do peixe picado, antes do tratamento enzimático, imergindo-o em água à ebulição por alguns minutos, seguido por prensagem da carne cozida.

REBECA et alii (1991) compararam a hidrólise de curimã (*Mugil cephalus*) utilizando as enzimas: Pescalase 560 (Gist Brocades nv.), HT Proteolytic 200 (HT-200) e Protease N (Amano) sendo todas proteases de *Bacillus subtilis*. A reação foi realizada sem a adição de água. A enzima que originou o produto com maior

quantidade de nitrogênio solúvel foi a Pescalase 560. Os autores sugeriram que os custos com a secagem do hidrolisado poderiam ser reduzidos, através do tratamento direto com a enzima, o que resultou em um maior conteúdo de sólidos no hidrolisado. Além disso, o produto apresentou excelentes valores de conteúdo protéico e de solubilidade.

Um problema do uso de hidrólise enzimática de proteínas é a formação do sabor amargo devido aos peptídios hidrofóbicos, resultantes da degradação do substrato (ADLER-NISSEN, 1984). O sabor amargo pode ser reduzido pela precipitação isoelétrica dos peptídios amargos.

Os hidrolisados protéicos por possuírem o sabor amargo têm aplicações limitadas em alimentos. CHAKRABARTI (1983) utilizou álcool etílico para remover os peptídios amargos após a secagem. Sugeriu o uso desta técnica antes da secagem, o que também diminuiria os custos de produção do hidrolisado protéico de pescado sem sabor amargo.

HOYLE & MERRITT (1994) compararam hidrolisados de arenque (*Clupea harengus*) e de arenque desengordurado feitos com Alcalase e papaína. A extração da gordura reduziu o grau de hidrólise. Os hidrolisados produzidos com Alcalase apresentaram maior grau de hidrólise e sabor menos amargo.

SHAHIDI et alii (1995) prepararam hidrolisados protéicos de *Mallotus villosus* com as enzimas alcalase, papaína e neutrase. Otimizaram a produção do hidrolisado protéico feito utilizando-se alcalase, por originar um produto com melhores propriedades funcionais e nutricionais, com alta solubilidade.

QUAGLIA & ORBAN (1990) mostraram que o aumento no grau de hidrólise da carne de sardinha (*Sardinella sp*), provocou efeitos negativos na capacidade de formar e estabilizar emulsões. Concluíram que o controle do grau de hidrólise permite a produção de hidrolisados com estruturas moleculares e propriedades de emulsificação desejáveis na formulação de alimentos.

CHEFTEL et alii (1971) hidrolisaram o concentrado protéico de cavalinha (*Urophysis chuss*) utilizando as seguintes enzimas comerciais: Pronase (*Streptomyces griseus*), pepsina, papaína, bromelina, ficina, Rhozyme P11, Rhozyme 41, enzima nº 56 (Rohm and Haas), Monzyme PA-1™ (*Bacillus subtilis*, Monsanto). Compararam as atividades das enzimas em relação à extensão e à taxa de solubilização e concluíram que a mais indicada para a hidrólise é a Pronase. Estudaram os efeitos do pH, temperatura, concentração desta enzima na extensão da hidrólise e obtiveram um produto com peptídios de baixo peso molecular.

LALASIDIS et alii (1978) produziram um hidrolisado protéico de bacalhau utilizando a enzima alcalase, uma endopeptidase, e em seguida a pancreatina, uma exopeptidase. Obtiveram um hidrolisado de baixo peso molecular, sem sabor amargo, com alto teor de aminoácidos livres e com aproximadamente 43 e 47% do nitrogênio total.

Os resíduos da filetagem de pescado podem ter seu valor agregado aumentado através da hidrólise enzimática. TARKY et alii (1973) obtiveram um hidrolisado protéico solúvel, não higroscópico, com um sabor levemente amargo, utilizando resíduos da filetagem de linguado (*Parophrys velutus*) e pepsina.

VIEIRA et alii (1995a) produziram hidrolisados protéicos de resíduos de lagosta (*Panulirus spp.*) utilizando papaína, pepsina e protease fúngica. Testaram o efeito da relação enzima/substrato na hidrólise e estudaram as propriedades funcionais do hidrolisado. Concluíram que o maior grau de hidrólise foi obtido com a protease fúngica e obtiveram hidrolisados altamente solúveis com excelente capacidade de emulsificação e sem sabor amargo.

YU & FAZIDAH (1994) produziram um hidrolisado protéico de carpa (*Aristichthys nobilis*), utilizando a enzima comercial Protease P 'Amano' 3 (Amano Pharmaceutical Co. Ltd., Japão), com alto conteúdo protéico, valor nutricional e alta solubilidade. O sabor amargo foi detectado após 3 horas de hidrólise.

As propriedades funcionais e nutricionais do pescado podem ser controladas e melhoradas através da hidrólise enzimática.

3.7. Utilização de Hidrolisados Protéicos

Hidrólise enzimática é geralmente usada para a modificação de propriedades funcionais de alimentos e em alimentos dietéticos como fonte de pequenos peptídios e aminoácidos. Como resultado de sua alta solubilidade e balanço de aminoácidos, o hidrolisado protéico de peixe tem vantagens óbvias sobre produtos secos como o concentrado protéico de peixe ou mesmo sobre a farinha de peixe para alimentação humana (VENUGOPAL, 1994).

CÂNDIDO (1998) utilizou um hidrolisado protéico de tilápia, de alto grau de hidrólise, como suplemento na elaboração de biscoitos, nutricionalmente modificados, para atletas e obteve uma boa aceitação.

OWENS e MENDONZA (1985) discutiram e classificaram produtos envolvendo hidrólise enzimática de pescado, como molhos e hidrolisados protéicos.

BOSTOCK & MONTAÑO (1983) produziram biscoitos enriquecidos com proteína de pescado e obtiveram 96,65% de aceitação por crianças.

REBECA et alii (1991) sugerem o uso de hidrolisados protéicos de pescado na indústria de panificação para aumentar o valor nutricional e a solubilidade de produtos, para substituir o leite para o gado e ser uma fonte altamente concentrada de nitrogênio solúvel.

VIEIRA et alii (1995b) sugeriram o uso de hidrolisados protéicos de resíduos de lagosta produzidos com protease fúngica como flavorizantes, já que o produto apresentou boas propriedades nutricionais e sensoriais.

YÁÑES et alii (1976) utilizaram um hidrolisado protéico de pescado para a fortificação de cereais como arroz, trigo e milho. Foi obtido um aumento tanto na quantidade como na qualidade das proteínas. Estes alimentos enriquecidos têm grande potencial para diminuir os problemas de fome e desnutrição, principalmente nos países subdesenvolvidos.

YU & FAZIDAH (1994) sugeriram o uso de hidrolisado protéico de carpa como suplemento protéico em biscoitos e massas para alimentação de crianças de regiões pobres.

Outra opção para a utilização de hidrolisados protéicos de pescado é a produção de rações. CARVALHO et alii (1997) estudaram dietas com altos níveis de hidrolisados protéicos na alimentação de carpas e obtiveram melhores resultados com a dieta baseada em hidrolisado protéico e caseína na proporção 1:1.

BERGE & STOREBAKKEN (1996) utilizaram um hidrolisado protéico de peixe na alimentação de salmão. Compararam dietas constituídas de rações comerciais, de farinha de peixe e de hidrolisados protéicos. O uso de hidrolisado protéico teve um efeito positivo no crescimento e peso final dos peixes.

3.8. Metodologia de Superfície de Resposta

A metodologia de Superfície de Resposta é uma técnica útil na investigação de processos complexos. Esta metodologia consiste de um grupo de procedimentos matemáticos e estatísticos que podem ser usados para estudar relações entre uma ou mais respostas (variáveis dependentes) e um número de fatores (variáveis independentes). Os efeitos das variáveis independentes e suas interações podem ser calculados. Além disso, através da metodologia do planejamento fatorial, pode-se obter um modelo matemático para se descrever o processo na região estudada.

DINIZ & MARTIN (1996) estudaram os efeitos do pH, temperatura e da relação enzima/substrato no grau de hidrólise de músculo de tubarão (*Squalus acanthias*) utilizando a enzima alcalase. Obtiveram um modelo matemático que descreve o processo na região estudada. A hidrólise foi otimizada nas seguintes condições de processo: pH 8,3, temperatura 53,6°C e relação enzima/substrato 3,6%. O grau de hidrólise previsto pelo modelo obtido foi 18,8%, o que indicou uma alta atividade proteolítica.

SHAHIDI et alii (1995) produziram hidrolisados protéicos de *Mallotus villosus*, uma espécie subutilizada de peixe encontrada na região Ártica, utilizando as enzimas alcalase, neutrase e papaína. Compararam a recuperação de proteínas dos três hidrolisados e verificaram que o feito com alcalase apresentou melhor desempenho. Otimizaram as condições de processo usando alcalase. As variáveis independentes estudadas foram o tempo e a temperatura de hidrólise e a concentração de enzima; a resposta foi o grau de hidrólise. A temperatura ótima para um período de incubação de 60 minutos foi 60°C e para 120 minutos 55°C.

SHAHIDI et alii (1994) otimizaram a produção de hidrolisado protéico de foca (*Phoca groenlandica*) utilizando as enzimas alcalase e neutrase. As variáveis independentes foram o tempo de hidrólise, a temperatura e a concentração de enzima e a variável dependente foi o grau de hidrólise. As condições de processo

ótimas foram: 2 horas de reação a 55°C e concentração de enzima de 60 AU/kg para alcalase e 30 AU/kg para neutrase. Obtiveram um produto com sabor suave, com alta solubilidade e boa composição de aminoácidos.

BAEK & CADWALLADER (1995) compararam as atividades proteolíticas de dez enzimas comerciais na hidrólise de resíduos da produção de lagosta. As enzimas estudadas foram: Alcalase, ProzymeTM, ProleatherTM, Protease 2^{ATM} e Protease STM (Amano International Enzyme Co., Inc., Troy, VA), OptimaseTM APL-440, HT-proteolyticTM, papaína e bromelina (Solvay Enzymes, Inc., Elkhart, IN) e tripsina. Utilizaram a Metodologia de Superfície de Resposta para otimizar a produção de um hidrolisado protéico de lagosta feito com a enzima OptimaseTM. Estudaram os efeitos do pH, temperatura e tempo de reação, concentração de substrato e relação enzima/substrato no grau de hidrólise e na quantidade de peptídios solúveis em TCA 0,3M. As condições ótimas encontradas foram: pH de 8 a 9, temperatura 65°C, tempo 2 horas e 30 minutos, concentração de substrato de 75% e relação enzima/substrato 0,3%.

Outros autores também aplicaram com sucesso a metodologia de Superfície de Resposta na otimização de processos de obtenção de alimentos (JOHNSON & ZABIK, 1981; HAMZA-CHAFFAI, 1990; ROUSSEL et alii, 1991; CUQ et alii, 1995; KOLLENGODE et alii, 1996).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Pescado

A matéria-prima utilizada foi a carne escura de atum (*Katsuwonus pelamis*), obtida como resíduo de uma indústria processadora de pescado localizada em Santos, São Paulo. O material foi obtido pré-cozido a 100°C por 1 hora, e então, triturado, embalado à vácuo e congelado a -20°C para uso posterior.

4.1.2. Enzimas

Foram utilizadas duas enzimas proteolíticas: Proteinase 1.5L (Prozyn) e Savinase® (Novo Nordisk).

A Proteinase 1.5L é um produto à base de proteases extraídas da fermentação de *Bacillus sp*, de grau alimentício, desenvolvido especialmente para a produção de hidrolisados protéicos sem sabor residual amargo.

A Savinase® é uma protease que contém serina caracterizada por sua excelente performance em pHs elevados. É produzida por um bacilo geneticamente modificado.

4.2. Métodos de Análises

4.2.1. Determinação do pH

O pH foi determinado em um pHmetro Mettler Toledo MP 125, com eletrodo Ingold.

4.2.2. Determinação de Umidade

A umidade foi determinada em estufa a 105°C, por 8 horas, segundo o método da A.O.A.C. (1980).

4.2.3. Determinação de Cinza

O teor de cinza foi determinado em mufla a 550°C, por 5 horas, segundo o método citado por LEES (1979).

4.2.4. Determinação de Proteína

O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método Micro-Kjeldahl (A.O.A.C., 1980). O teor de proteína foi calculado multiplicando-se o conteúdo de nitrogênio total pelo fator 6,25.

4.2.5. Determinação do Nitrogênio Não Protéico

O nitrogênio não protéico foi determinado segundo o método da A.O.A.C (1980), utilizando o ácido tricloroacético que precipita a fração protéica.

4.2.6. Determinação de Lipídios Totais

O teor de lipídios totais foi determinado segundo o método descrito por BLIGH & DYER (1959).

4.2.7. Determinação de Grupo α -amino livre

Para a determinação de grupos α -amino livres foi utilizado o método espectrofotométrico descrito por ADLER-NISSEN (1979), sendo a absorbância lida a 420nm.

4.2.8. Determinação do Valor TBA

A determinação do nível de oxidação lipídica na matéria-prima foi feita através da quantificação de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). O método utilizado foi descrito por TARLADGIS et alii (1960).

4.2.9. Solubilidade

A solubilidade do produto seco foi determinada segundo o método descrito por MORR et alii (1985). A amostra foi dissolvida em NaCl 0,1N e o pH ajustado em 7,0. A solução foi centrifugada a, 20000 x g (13500 rpm), por 30 minutos. Para o cálculo da solubilidade, o conteúdo de proteína do sobrenadante, previamente filtrado, foi calculado pelo método Micro-Kjeldahl (A.O.A.C., 1980).

4.2.10. Determinação da Atividade Proteolítica

O método utilizado para a determinação da atividade proteolítica das enzimas utilizadas foi o descrito por IADEROZA & BALDINI (1991). A caseína foi hidrolisada a 50°C por 20 minutos e a reação interrompida com TCA 5%. A solução foi filtrada e a absorbância foi lida a 280nm. Várias concentrações de enzima foram testadas. A atividade proteolítica das enzimas foi calculada utilizando-se uma curva padrão de tirosina.

4.2.11. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para a eletroforese SDS-PAGE dos hidrolisados foi seguido o procedimento descrito por LAEMMLI (1970), com modificações. Utilizou-se um gel de separação com gradiente de concentração de 7 a 20% de acrilamida e um gel de concentração a 4%. A eletroforese foi conduzida à temperatura ambiente em uma unidade Bio-Rad Mini-Protean® II Cell, empregando-se 100 V e 46 mA. A solução corante utilizada foi Comassie Blue G 250 e para descorar o gel utilizou-se água destilada. O padrão utilizado foi o LMW (Pharmacia).

Os pesos moleculares dos hidrolisados protéicos de carne escura de atum foram determinados por Densitometria através do Software Image Master 1D Prime (Pharmacia).

4.2.12. Determinação de Aminoácidos

Para a determinação de aminoácidos, as amostras da matéria-prima, e dos hidrolisados protéicos, feitos com as enzimas Proteinase 1.5L e Savinase® foram hidrolisadas com HCl 6N, a vácuo, a 110°C por 22 horas. As amostras foram recuperadas com tampão pH 2,2 (Marca Pickering). Alíquotas de 25 µl das amostras foram injetadas em um Analisador Dionex DX 300 para a separação dos aminoácidos, em coluna de troca iônica e reação pós-coluna com ninidrina, usando-se como referência o padrão de aminoácidos Pierce (SPACKMAN et alii, 1958).

4.2.13. Avaliação do Grau de Hidrólise pelo método de pH-stat

O grau de hidrólise (DH) foi definido por ADLER-NISSEN (1986) como sendo o número de ligações peptídicas hidrolisadas ou como número de aminoácidos formados durante a proteólise, expressado como equivalentes de hidrólise (h) em relação ao número total de ligações peptídicas antes da hidrólise (h_{total}). O h_{total} é equivalente a composição de aminoácidos da proteína expressado como mmol/g de proteína.

$$DH (\%) = \frac{\text{número de ligações peptídicas hidrolisadas}}{\text{número total de ligações peptídicas}} = \frac{h}{h_{total}} \times 100 \quad (4.2.13.1)$$

O cálculo do grau de hidrólise foi feito através do método de titulação de grupos α -amino liberados em pH e temperatura constantes (ADLER-NISSEN, 1977).

Nos experimentos, para o cálculo do DH, foi utilizado valor de h_{total} igual a 7,3 (ANÔNIMO, 1978; citado por DINIZ & MARTIN, 1996).

Quando uma ligação peptídica é hidrolisada a pH superior a 6,5, o grupo carboxi terminal formado contribui para o abaixamento do pH. O consumo de base (medido por titulação) necessário para manter o pH constante durante a reação é utilizado no cálculo do DH. Considerando que o pK médio dos grupos amino seja constante, deverá existir proporcionalidade entre a liberação de prótons (igual ao consumo de base) e a quantidade de ligações peptídicas hidrolisadas. O fator de proporcionalidade será o grau de dissociação dos grupos α -amino (α):

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pK-pH}} \quad (4.2.13.2)$$

onde o valor de pK varia com a temperatura da hidrólise.

$$pK = 7,8 + \frac{(298 - T)}{(298 \times T)} \times 2400 \quad (4.2.13.3)$$

onde T é a temperatura em Kelvin.

Para valores de pH próximos ao pK, α é igual a 0,5. Para valores superiores, aproxima-se de 1, variando também com a temperatura. Para o cálculo do DH utiliza-se a equação:

$$DH = \frac{1}{\alpha \times h_{total}} \times \frac{B \times N_b}{MP} \times 100 \quad (4.2.13.4)$$

onde:

B = consumo de base (ml)

Nb = normalidade da base (N)

MP = massa de proteína (g)

α = grau de dissociação

4.3. Preparo do Hidrolisado Protéico de Pescado

O hidrolisado protéico de pescado foi produzido através da digestão proteolítica da carne escura do atum, a qual foi previamente homogeneizada em um multiprocessador.

A Figura 4.1 apresenta um fluxograma de obtenção de hidrolisado protéico de pescado.

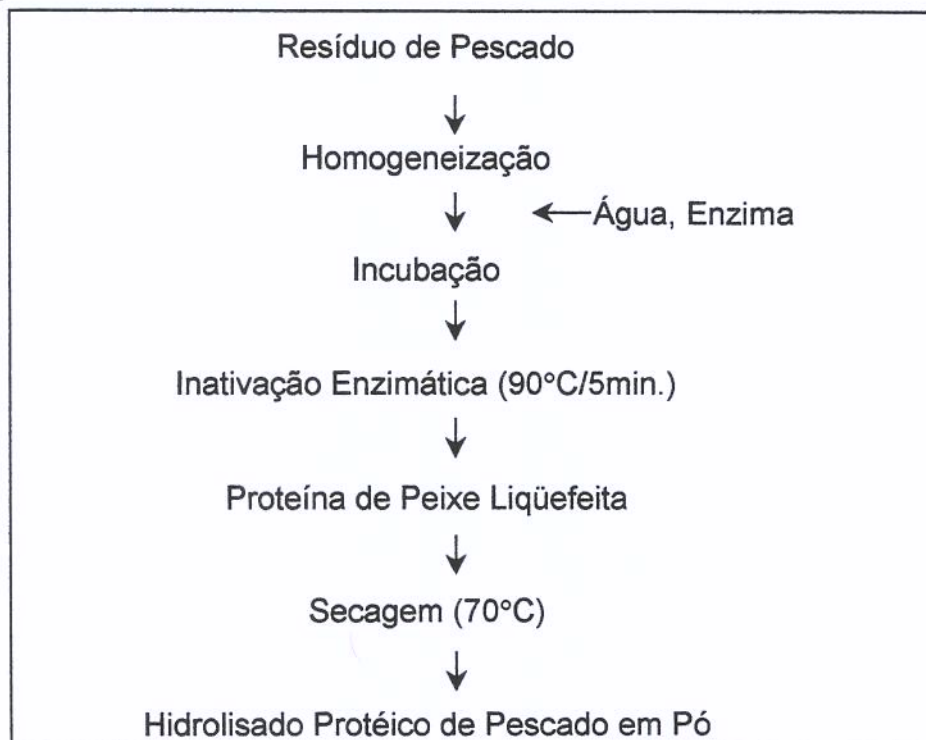


Figura 4.1: Fluxograma de obtenção do Hidrolisado Protéico de Pescado

4.4. Testes Preliminares

4.4.1. Procedimento de Hidrólise Enzimática

Foram comparados três procedimentos de obtenção de hidrolisado protéico de carne escura de atum para avaliar a hidrólise em relação as quantidades de Nitrogênio Não Protéico e Grupos α -amino livres. A enzima utilizada foi a Proteinase 1.5L. Os parâmetros de hidrólise utilizados foram: pH 7, temperatura 40°C e relação enzima/substrato 1/68. O pH não foi controlado durante a reação. Foi adicionada água na proporção 1:1 em relação a matéria-prima. A hidrólise foi acompanhada durante 4 horas. Os seguintes procedimentos foram estudados:

- Procedimento 1: 100g de amostra foram colocados em erlenmeyers de 250mL, sendo adicionados 100mL de água. Os erlenmeyers foram colocados em

incubadora com agitação e controle de temperatura, onde a cada hora foi retirado um erlenmeyer;

- Procedimento 2: 200g de amostra foram colocados em um erlenmeyer de 500mL, sendo adicionados 200mL de água. O erlenmeyer foi colocado em incubadora com agitação e controle de temperatura, e alíquotas foram retiradas a cada hora;
- Procedimento 3: 250g de amostra foram colocadas em um béquer de 1000mL, sendo adicionados 250mL de água. O béquer foi colocado em um banho com controle de temperatura e utilizou-se um agitador mecânico (112 rpm) para homogeneizar a mistura durante a reação. Alíquotas foram retiradas a cada hora.

4.4.2. Influência da Temperatura no Grau de Hidrólise

No intuito de se avaliar a faixa de temperatura a ser estudada no planejamento fatorial posterior, foi feito um estudo da influência da temperatura na hidrólise enzimática na carne escura de atum.

O processo de hidrólise foi realizado segundo o Procedimento 3 descrito no item 4.4.1 e foi acompanhado através da liberação de Nitrogênio Não Protéico e Grupos α -amino. Utilizou-se a enzima Proteinase 1.5L e a relação enzima/substrato foi 1/68. As temperaturas utilizadas foram 30, 40 e 50°C.

4.4.3. Determinação do Tempo de Hidrólise

Três experimentos foram realizados nas condições do ponto central (Tabela 4.1) para avaliar o tempo necessário para atingir um máximo grau de hidrólise. A hidrólise foi realizada em pH-stat (Item 4.2.13) e titulação com NaOH 0,2N. O grau de hidrólise foi calculado na primeira hora a cada 15 minutos e nas horas posteriores a cada 30 minutos. Um teste de Tukey ($p < 0,05$) foi utilizado para determinar o tempo a partir do qual não houve variação significativa no grau de hidrólise.

4.5. Metodologia de Superfície de Resposta

Foram realizados três planejamentos experimentais: dois com a Proteinase 1.5L e um com a Savinase®.

As variáveis independentes foram o pH, a temperatura e a relação enzima substrato. Avaliou-se a influência das variáveis independentes no grau de hidrólise.

4.5.1. Planejamento Experimental 2^3 – Proteinase 1.5L

Verificou-se a influência do pH, temperatura (T) e relação enzima substrato (E/S) no grau de hidrólise. A Tabela 4.1 apresenta as condições estudadas. A sequência dos experimentos foi realizada em ordem aleatória.

As reações de hidrólise foram realizadas segundo o Procedimento 3 descrito no item 4.4.1. Foi adicionada água na proporção 1:1. O pH foi ajustado manualmente na primeira hora a cada 15 minutos e nas horas posteriores a cada 30 minutos, utilizando-se uma bureta com NaOH 0,2 N.

Tabela 4.1: Parâmetros de hidrólise da carne escura de atum-Proteinase 1.5L

Níveis	-1	0	+1
pH	6,75	7	7,25
T(°C)	40	50	60
E/S(%)	0,1	0,2	0,3

4.5.2. Planejamento Experimental 2^2 – Proteinase 1.5L

Um planejamento fatorial completo 2^2 foi realizado, nas condições descritas na Tabela 4.2, onde foram avaliados apenas os efeitos das variáveis pH e E/S, uma vez que no planejamento 2^3 (Item 4.5.1), a temperatura não influenciou significativamente no processo de hidrólise, nas condições estudadas. A sequência dos experimentos foi realizada em ordem aleatória.

As reações de hidrólise foram realizadas em um equipamento pH-stat (Mettler-Toledo DL-50 Graphix).

Para o processo de hidrólise foi adicionada água na proporção 2:1. O pH foi ajustado pela adição NaOH 1N.

Tabela 4.2: Parâmetros de hidrólise da carne escura de atum-Proteinase 1.5L

Níveis	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
pH	6,577	6,7	7	7,3	7,423
E/S(%)	0,059	0,1	0,2	0,3	0,341

$\alpha = (2^n)^{1/4} = 1,41$, onde n= número de variáveis independentes

4.5.3. Planejamento Experimental 2^3 – Savinase®

Um planejamento fatorial completo 2^3 foi realizado, nas condições descritas na Tabela 4.3, para avaliar a influência do pH, temperatura (T) e relação enzima substrato (E/S) no grau de hidrólise. A seqüência dos experimentos foi realizada em ordem aleatória.

As reações de hidrólise foram realizadas no equipamento pH-stat (Mettler-Toledo DL-50 Graphix).

Para o processo de hidrólise foi adicionada água na proporção 2:1. O pH foi ajustado pela adição NaOH 1N.

Tabela 4.3: Parâmetros de hidrólise da carne escura de atum-Savinase®

Níveis	$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
pH	8,496	8,7	9	9,3	9,504
T	36,6	40	45	50	53,4
E/S(%)	0,032	0,1	0,2	0,3	0,368

$\alpha = (2^n)^{1/4} = 1,68$, onde n= número de variáveis independentes

4.6. Secagem

Foram avaliados dois métodos de secagem do hidrolisado protéico de carne escura de atum: secagem em estufa e em secador de leite de jorro, a fim de se comparar a solubilidade dos produtos obtidos.

4.6.1. Secagem em Estufa

A secagem foi feita a 70°C durante 8 horas em uma estufa com circulação de ar (MA033-Marconi), disponível no Departamento de Engenharia de Alimentos da FEA.

4.6.2. Secagem em Secador de Leite de Jorro

A Figura 4.2 apresenta um esquema geral do secador de leite de jorro cônico do Departamento de Engenharia de Alimentos da FEA.

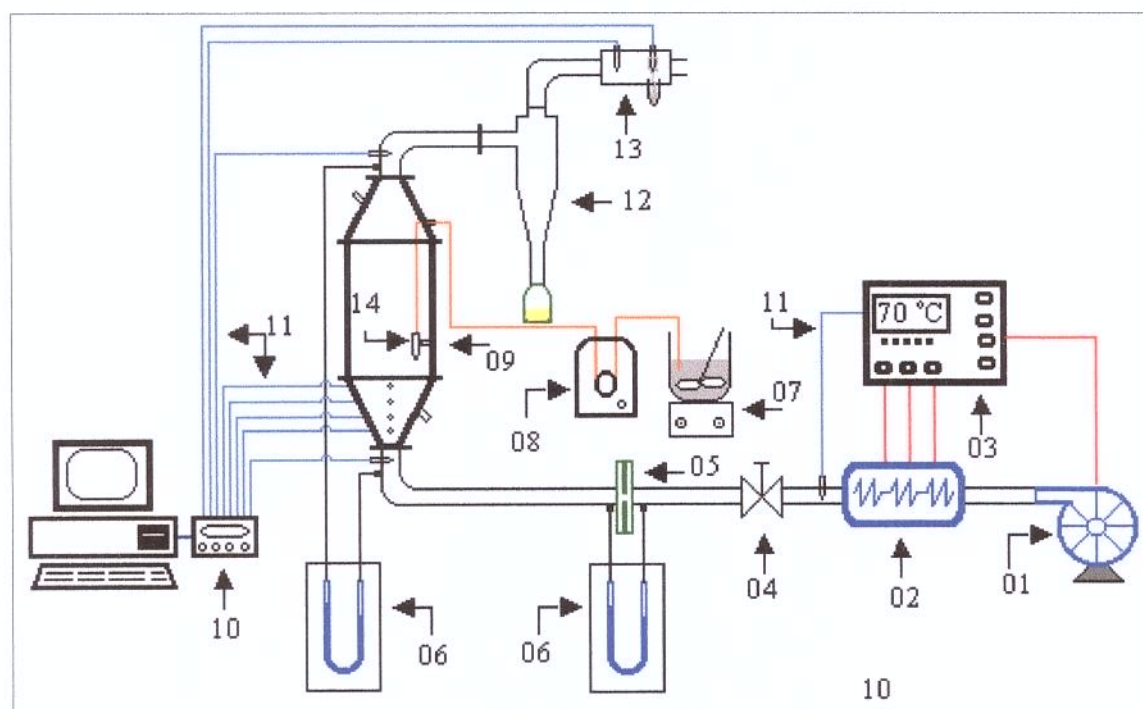


Figura 4.2: Esquema de um Secador de Leite de Jorro

(Fonte: RODRIGUES, 2000)

O equipamento consiste de uma base cônica de aço inox com ângulo de 60°, diâmetro do orifício de entrada de 50 mm e diâmetro superior de 300 mm. Uma coluna de vidro cilíndrica de 300 mm de diâmetro e 400 mm de altura está acoplada a base cônica. Sobre esta coluna há um outro cone de aço inox com ângulo de 60°. Foram utilizadas esferas de vidro de 2 mm.

Para manter o hidrolisado homogêneo antes de ser injetado no secador de jorro, utilizou-se um agitador magnético (7). A amostra foi injetada no equipamento utilizando-se uma bomba peristáltica (8) Masterflex pump (7520-55, Cole Palmer Instrument Co.).

O ar quente (70°C) entrou no equipamento pela parte inferior, colocando as esferas de vidro em suspensão. A amostra foi gotejada no interior do equipamento recobrando as esferas (14). O hidrolisado em pó saiu através do Ciclone (12) na parte superior do equipamento.

O tempo de residência no secador de jorro cônico, um processo contínuo, foi de aproximadamente 15 minutos.

4.7. Validação dos Modelos

Após a otimização do processo de hidrólise, foi feita a validação dos modelos nos pontos de ótimo de pH, temperatura e relação E/S. Foram realizados três experimentos para cada enzima e os valores do grau de hidrólise assim obtidos foram comparados com os preditos pelo modelo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da Matéria-prima

5.1.1. Composição Centesimal

A Tabela 5.1 apresenta a caracterização da matéria prima utilizada nos experimentos.

**Tabela 5.1: Composição centesimal e relação
NNP/NT do atum***

	Matéria-prima
Umidade (%)	64,63 ± 0,08
Proteína Bruta (%)	26,88 ± 0,25
Lipídios (%)	5,79 ± 0,05
Cinzas (%)	1,85 ± 0,03
NNP/NT (%)	14,08

*carne escura cozida

Em um estudo realizado por CRISTIANINI (1998), o autor determinou a composição centesimal do atum (*Katsuwonus pelamis*) e obteve os seguintes resultados: 68% de umidade, 30,2% de proteína, 0,8% de gordura e 1,3% de cinza. Segundo CONTRERAS-GUZMAN (1994), a carne escura de atum possui 69,2-71,3% de umidade, 21,0-23,0% de proteína, 5,54-6,86% de gordura e 1,19-1,20% de cinza. Pode-se notar pela Tabela 5.1 que a composição centesimal obtida neste trabalho apresenta uma pequena variação dos valores apresentados pelos autores acima mencionados. A composição centesimal de pescado é influenciada pela idade, sexo, desenvolvimento gonadal e época do ano.

5.1.2. Determinação do Valor TBA

Produtos primários de oxidação lipídica constituem-se, principalmente, de hidroperóxidos, que são rapidamente decompostos em várias substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo o malonaldeído o

elemento mais importante (TARLADGIS et alii, 1960). A Figura 5.1 apresenta a curva padrão de 1,1',3,3' tetraetoxipropano (TEP), utilizada para a determinação da quantidade de malonaldeído das amostras.

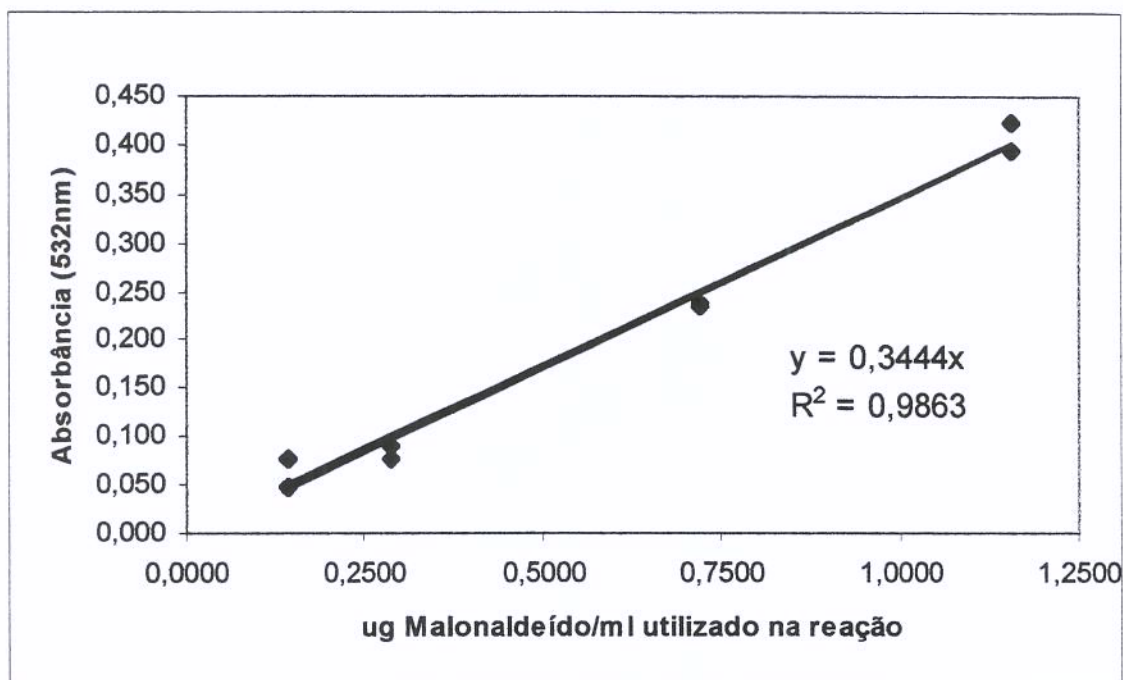


Figura 5.1: Curva padrão para determinação do valor TBA

A carne escura de atum cozida apresentou $347,56 \pm 23,58$ mg de malonaldeído/1000g de amostra. Uma amostra "in natura", recém capturada, comprada em um mercado local, apresentou $2,07 \pm 0,13$ mg de malonaldeído/1000g de amostra.

Observou-se um aumento significativo na quantidade de malonaldeído durante o armazenamento e processamento na indústria. MARQUES (2000) verificou que o armazenamento de pescado sob congelamento favorece o desencadeamento da oxidação de lipídios, que origina compostos que interagem com proteínas miofibrilares, diminuindo as propriedades funcionais do material.

KELLEHER et alii (1992) concluíram que a adição de antioxidantes, após a moagem do arenque, para a produção de surimi, ajudou a melhorar os danos

iniciais causados pela oxidação lipídica, porém a estabilidade não era mantida durante o armazenamento sob congelamento. KELLEHER et alii (1994) determinaram um procedimento para minimizar a oxidação e o desenvolvimento da rancidez, adicionando antioxidantes solúveis em água e em lipídios, evitando a adição de NaCl e a exclusão do oxigênio.

A matéria prima utilizada no presente estudo é proveniente de um pescado que foi submetido a processos de congelamento, descongelamento, imersão em salmoura e cocção na indústria. Posteriormente, a matéria prima sofreu trituração, congelamento e descongelamento para uso no laboratório. Sendo assim, é esperado um alto nível de oxidação do mesmo.

5.2. Determinação das Atividades Proteolíticas

Para a determinação da atividade proteolítica, a caseína foi utilizada como substrato (Item 4.2.10) e a atividade foi determinada através de uma curva padrão de tirosina formada (Figura 5.2). Foram testadas várias concentrações para as duas enzimas (Anexo 1). Os cálculos foram feitos dentro da faixa de Absorbância da curva padrão. A Proteinase 1.5L apresentou uma atividade de 6248 U e a Savinase® 21047 U, sendo U a quantidade de enzima (mg) que libera 1 mg de tirosina (IADEROZA & BALDINI, 1991). Pode-se concluir, então, que a Savinase® possui uma atividade proteolítica muito maior que a Proteinase 1.5L.

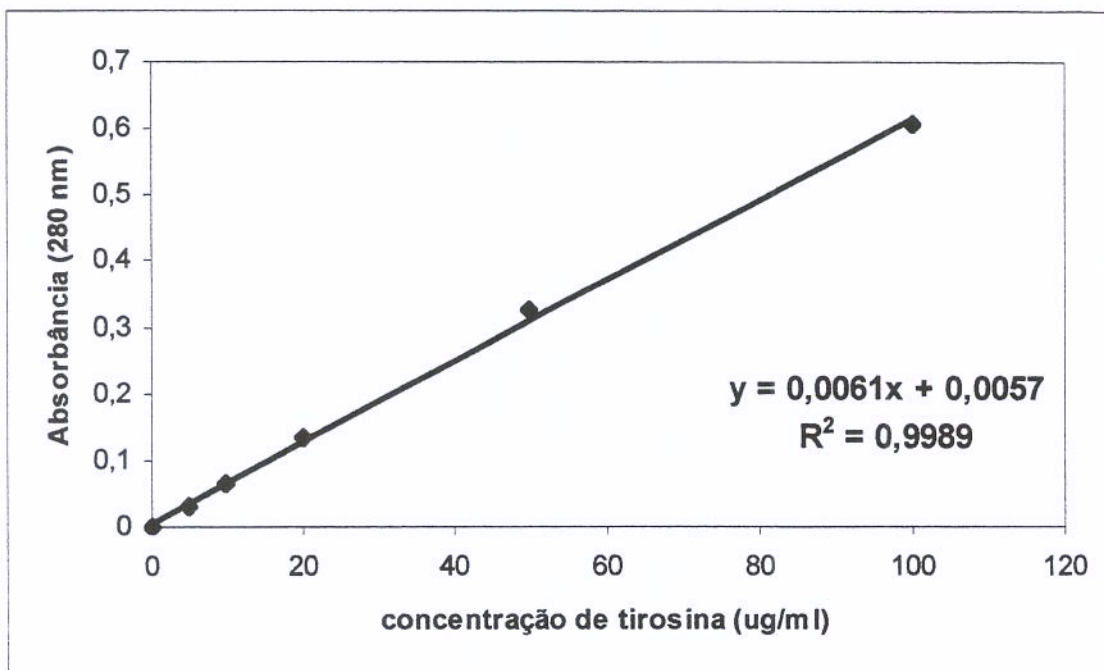


Figura 5.2: Curva padrão para determinação da atividade proteolítica, via tirosina formada

5.3. Resultados dos Testes Preliminares

5.3.1. Procedimento de Hidrólise Enzimática

Foram comparados três procedimentos de hidrólise enzimática de carne escura de atum descritos no Item 4.2.1. As curvas de hidrólise, obtidas para a comparação dos procedimentos de obtenção de hidrolisado protéico, estão apresentadas nas Figuras 5.3 e 5.4. Foram monitoradas as quantidades de nitrogênio não protéico e grupos α -amino livres.

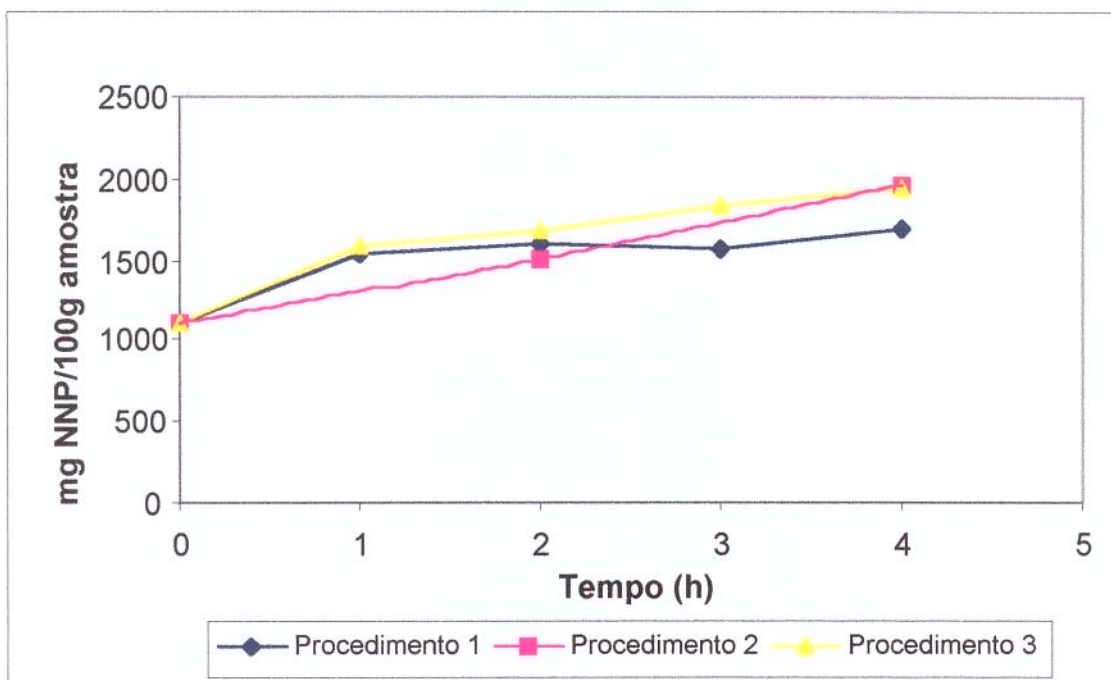


Figura 5.3: Nitrogênio Não Protéico nos três procedimentos para obtenção de hidrolisado protéico de carne escura de atum

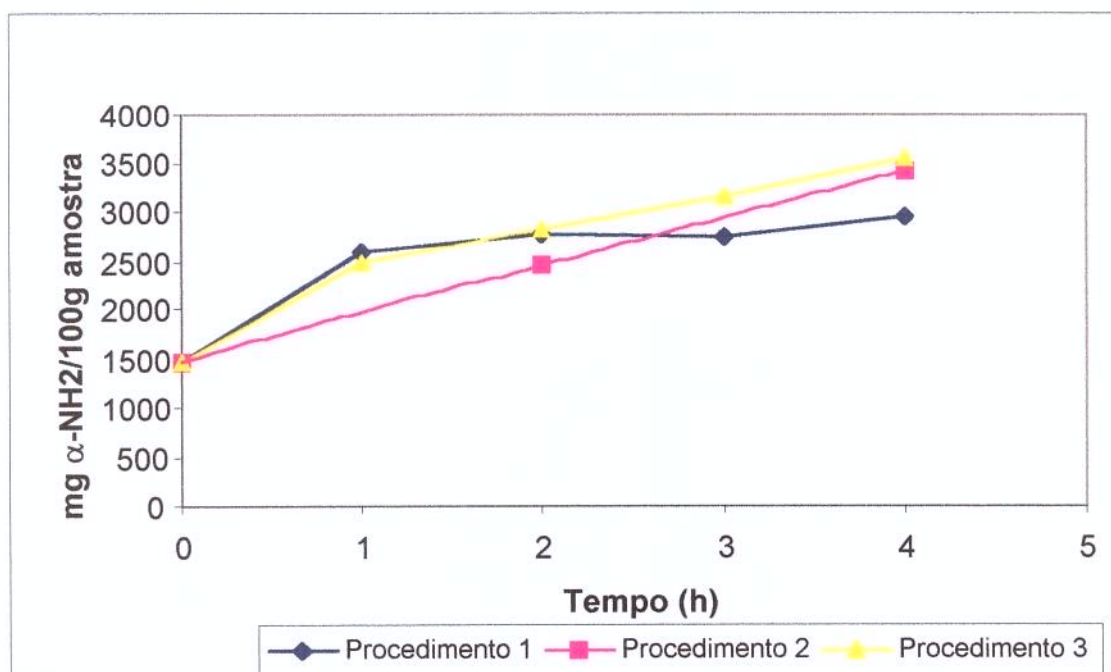


Figura 5.4: Grupos α-amino livres nos três procedimentos para obtenção de hidrolisado protéico de carne escura de atum

Comparando-se as curvas de hidrólise das Figuras 5.3 e 5.4, pode-se verificar que o Procedimento 3, onde a amostra foi hidrolisada em béquer de 1000mL, com agitador mecânico, apresentou curvas mais suaves e sempre progressivas no intervalo avaliado. Assim, este ensaio foi reproduzido como base para os testes seguintes de avaliação da influência da temperatura na hidrólise da carne escura de atum.

5.3.2. Influência da Temperatura

Utilizando o Procedimento 3, onde a hidrólise ocorreu em um béquer de 1000 mL, foi avaliado o efeito da temperatura na obtenção de hidrolisado protéico de carne escura de atum. As curvas obtidas para a comparação do efeito das três temperaturas 30, 40 e 50°C, na hidrólise enzimática da carne escura de atum, estão apresentadas nas Figuras 5.5 e 5.6. Foram monitoradas as quantidades de nitrogênio não protéico e grupos α -amino livres.

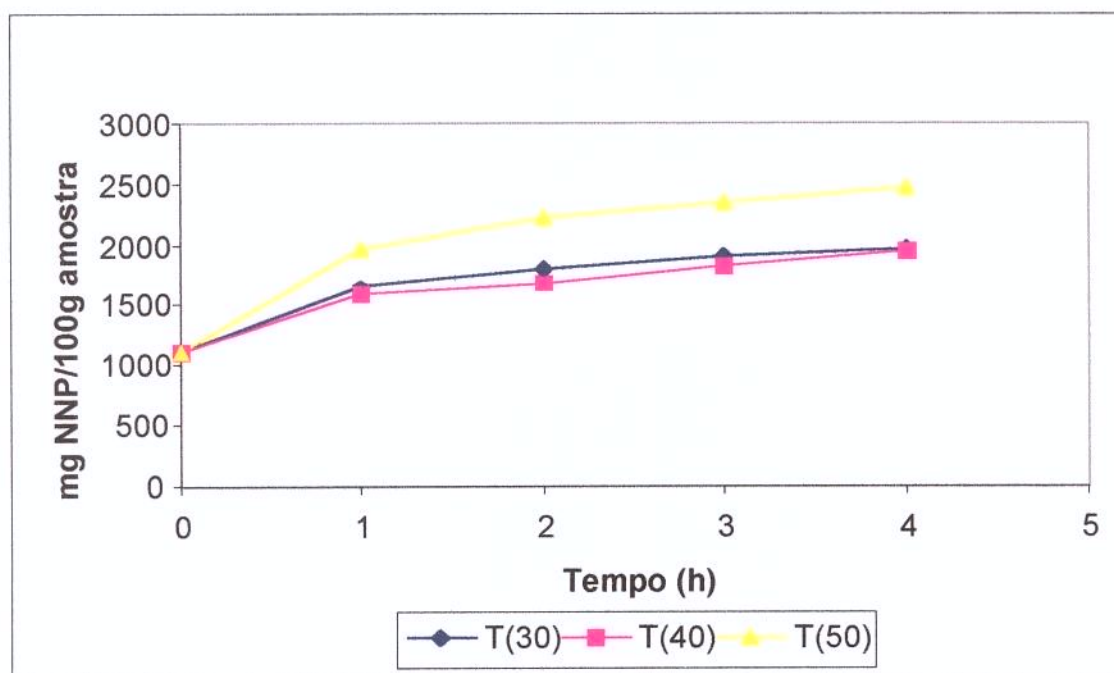


Figura 5.5: Nitrogênio Não Protéico para as três temperaturas de hidrólise da carne escura de atum

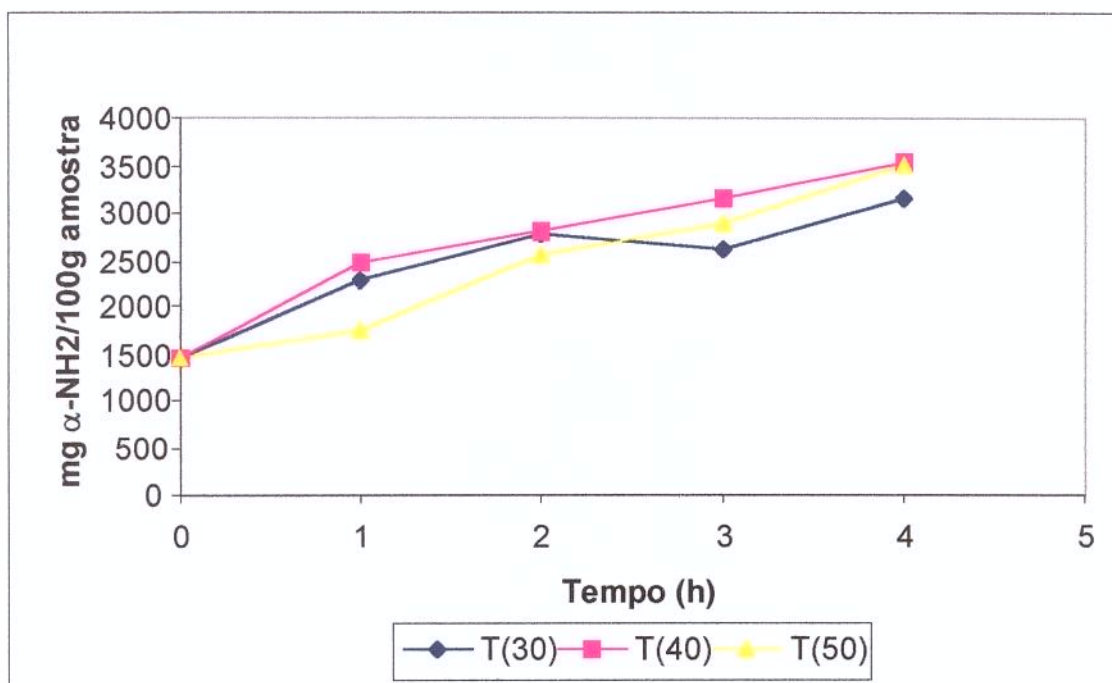


Figura 5.6: Grupos α -amino livres para as três temperaturas de hidrólise da carne escura de atum

Observando-se a Figura 5.5, pode-se verificar que as temperaturas de 30 e 40°C apresentaram resultados muito próximos. De maneira análoga, a análise da Figura 5.6, apresentou valores muito próximos de quantidades de grupos α -amino liberados. Sendo assim, no planejamento experimental posterior foi utilizada uma faixa de temperatura maior (de 40 a 60°C).

5.3.3. Determinação do Tempo de Hidrólise

Para a determinação do tempo de hidrólise, foi realizado um experimento em triplicata, nas condições descritas no Item 4.3.3. Os processos foram avaliados por 3 horas e verificou-se que o grau de hidrólise não variou significativamente ($p < 0,05$) após o período de 2h30min. O tempo de hidrólise foi determinado em 2h30min. As curvas de hidrólise estão apresentadas na Figura 5.7. A avaliação estatística, via teste de Tukey, está apresentada no Anexo 2.

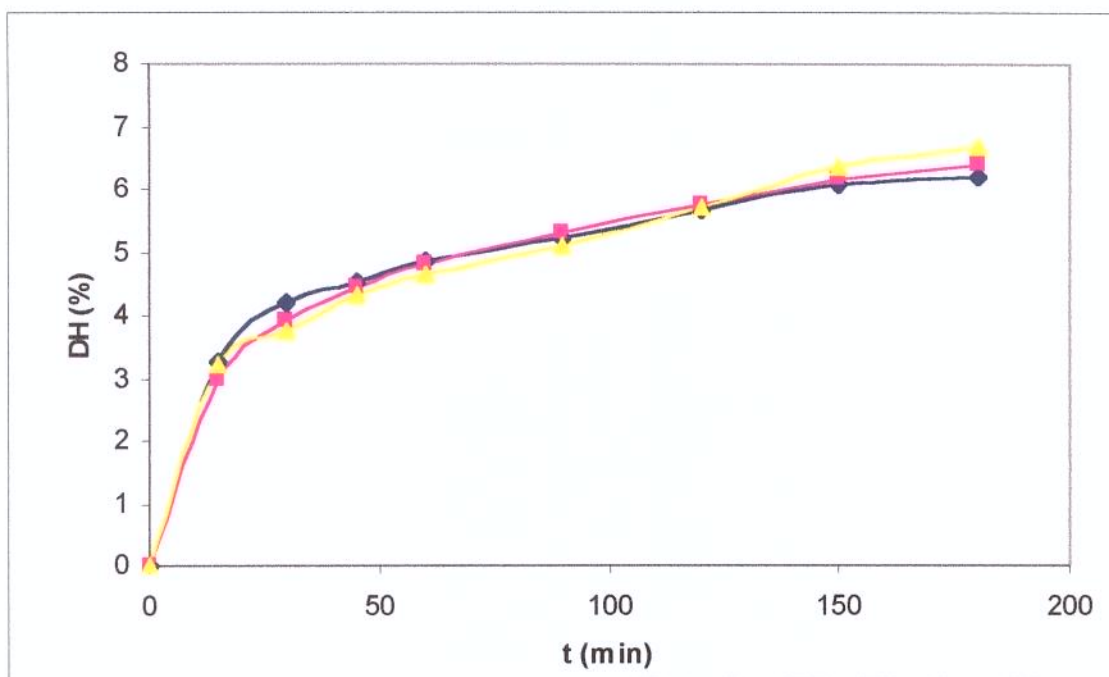


Figura 5.7: Hidrólise (DH%) da carne escura de atum, utilizando Proteinase 1.5L em pH 7, T 50°C e E/S 0,2%

Pode-se observar pela Figura 5.7 que a velocidade de hidrólise é alta na primeira hora, e mais lenta nas horas seguintes.

5.4. Hidrólise Enzimática

5.4.1. Planejamento Experimental 2^3 – Proteinase 1.5L

Os níveis das variáveis independentes (pH, temperatura e relação enzima substrato) estão descritos na Tabela 4.1. Os ensaios e a resposta (grau de hidrólise) estão apresentados na Tabela 5.2; a Figura 5.8 apresenta as curvas de hidrólise.

Tabela 5.2: Planejamento Experimental
2³ – Proteinase 1.5L

Ensaio	pH	T	E/S	DH (%)
1	-1	-1	-1	8,90
2	+1	-1	-1	6,05
3	-1	+1	-1	7,19
4	+1	+1	-1	4,61
5	-1	-1	+1	6,76
6	+1	-1	+1	7,96
7	-1	+1	+1	8,31
8	+1	+1	+1	7,28
9	0	0	0	6,92
10	0	0	0	8,78
11	0	0	0	7,60

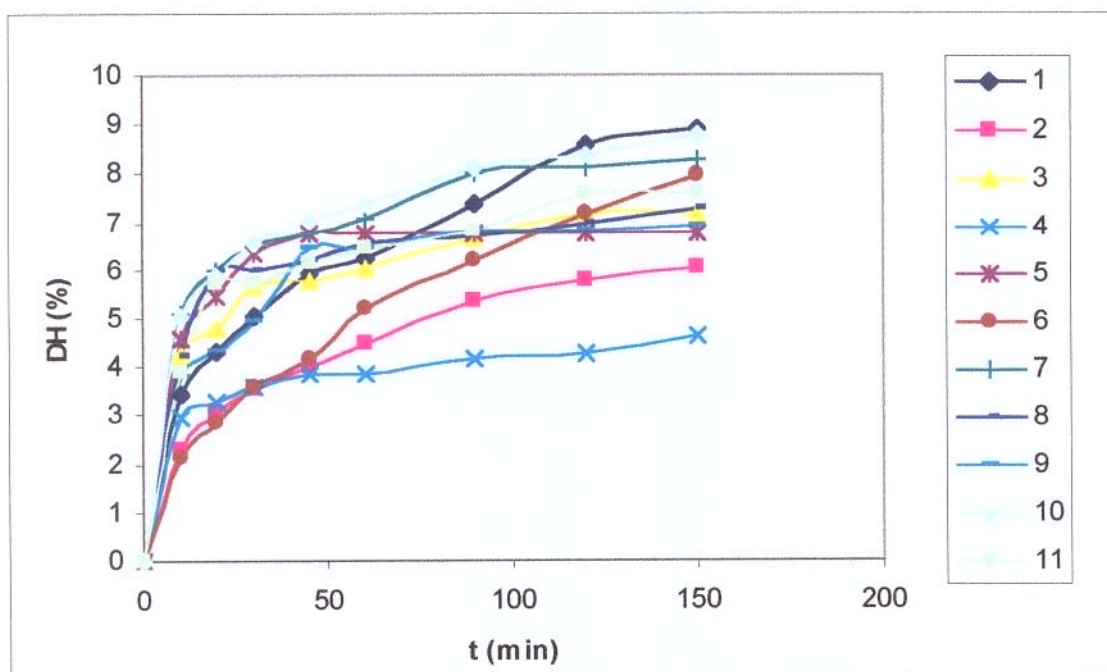


Figura 5.8: Hidrólise (DH%) da carne escura de atum, utilizando Proteinase 1.5L – Planejamento Experimental 2³

Verificou-se através do cálculo do erro puro (Anexo 2), uma variação na resposta quando os ensaios foram realizados nas mesmas condições (pontos centrais). Isto provavelmente pode ser explicado devido à falta de homogeneidade do material envolvido no experimento, decorrente da obtenção de um produto com alto teor de sólidos, sendo a adição de água na proporção 1:1 insuficiente para a completa dissolução da amostra.

A Figura 5.9 apresenta os efeitos de três variáveis independentes: pH, temperatura e concentração de enzima na reação de hidrólise, após 150 minutos. Os cálculos estão descritos no Anexo 2.

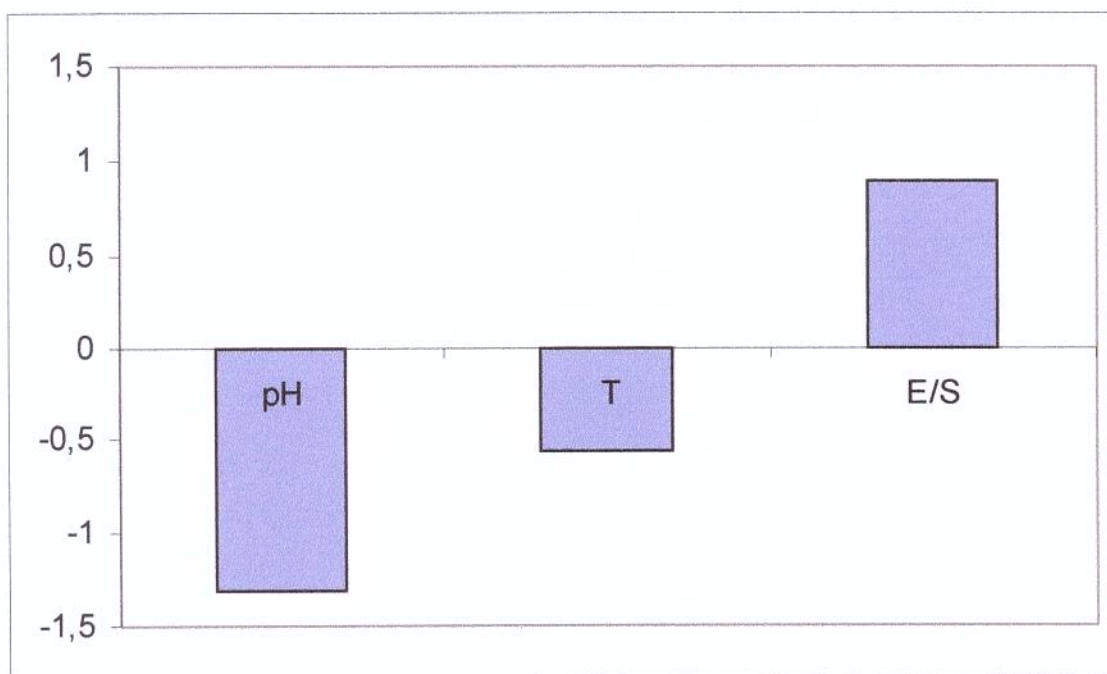


Figura 5.9: Efeitos do pH, Temperatura, e relação E/S, na hidrólise enzimática de carne escura de atum, utilizando a enzima Proteinase 1.5L

Pode-se verificar pela Figura 5.9 que a variável de maior efeito no grau de hidrólise foi o pH, seguida da relação enzima substrato. Com a diminuição do pH, o grau de hidrólise aumenta. Verificou-se, na região de temperaturas estudadas, que esta variável tem pouca influência no grau de hidrólise do produto, sendo assim foi realizado um novo planejamento experimental completo 2^2 , com duas variáveis independentes, pH e relação enzima substrato, mantendo-se a temperatura constante a 40°C. Esta temperatura foi escolhida pois possibilita uma maior economia de energia durante o processo industrial.

5.4.2. Planejamento Experimental 2^2 – Proteinase 1.5L

Um novo planejamento fatorial completo 2^2 foi realizado onde os níveis das variáveis independentes estão descritos na Tabela 4.2. Os ensaios e a resposta (grau de hidrólise) estão apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3: Planejamento Experimental
Fatorial Completo 2^2 –
Proteinase 1.5L

Ensaio	pH	E/S	DH (%)
1	-1	-1	9,11
2	+1	-1	4,40
3	-1	+1	11,67
4	+1	+1	5,38
5	0	0	7,16
6	0	0	6,67
7	0	0	6,98
8	$-\alpha$	0	11,19
9	$+\alpha$	0	4,79
10	0	$-\alpha$	4,41
11	0	$+\alpha$	8,53

A Figura 5.10 apresenta as curvas de hidrólise obtidas nos experimentos do planejamento 2^2 da Proteinase 1.5L.

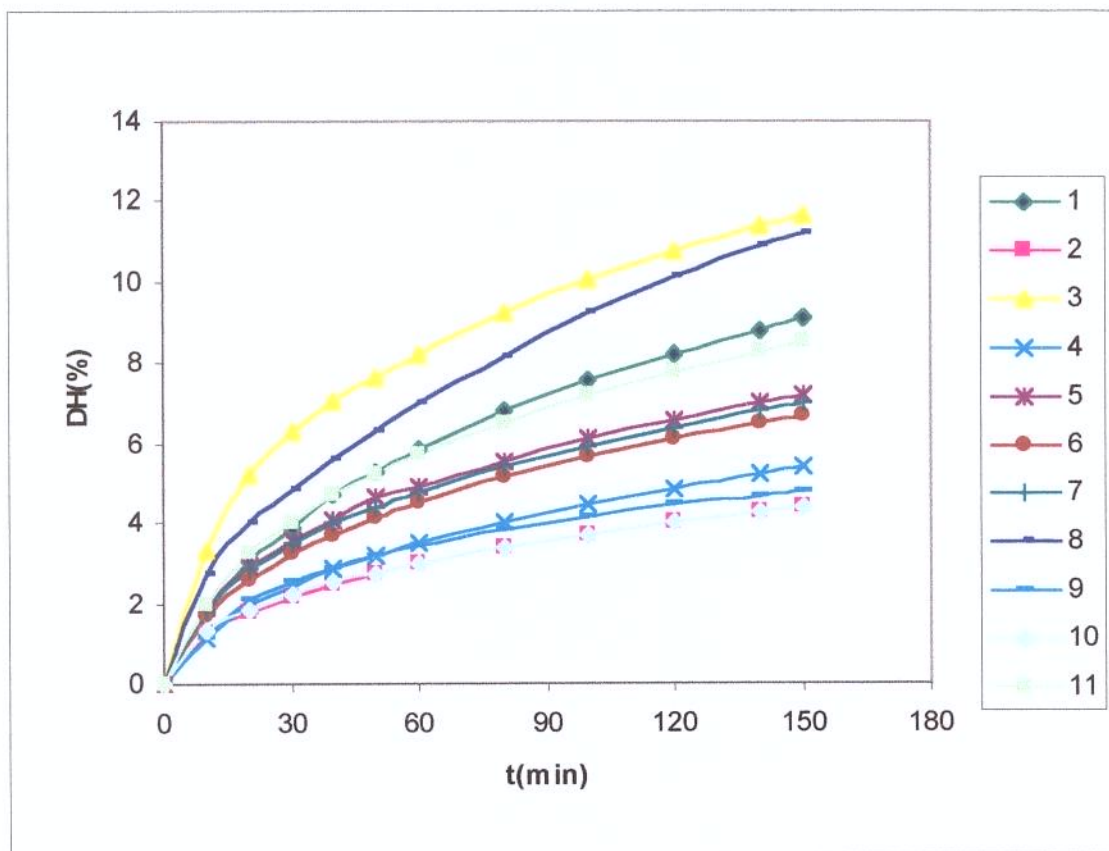


Figura 5.10: Hidrólise (DH%) da carne escura de atum, utilizando Proteinase 1.5L – Planejamento Experimental 2^2

Observando-se as curvas de hidrólise da Figura 5.10, pode-se concluir que o uso do equipamento pH-stat melhorou a reprodutibilidade do processo, uma vez que as curvas dos pontos centrais estão bem próximas (5, 6, 7).

A Figura 5.11 apresenta os efeitos do pH e da relação enzima/substrato no grau de hidrólise do produto, utilizando-se a Proteinase 1.5L.

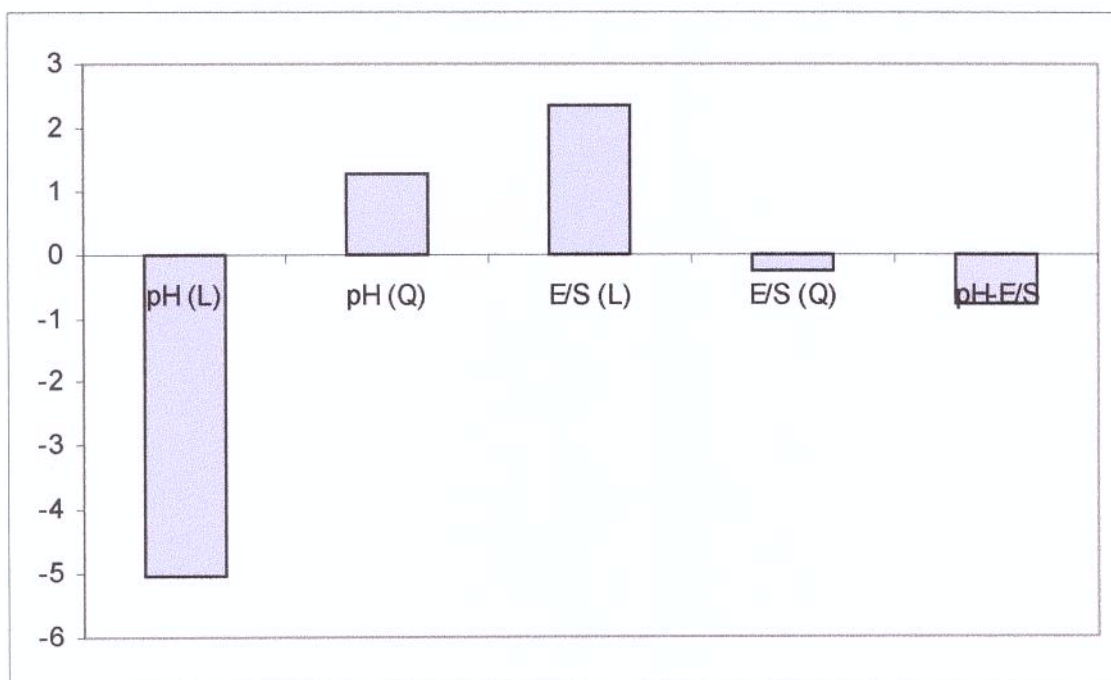


Figura 5.11: Efeitos do pH e relação E/S na hidrólise de carne escura de atum utilizando Proteinase 1.5L (L=linear; Q=quadrático)

Pode-se observar que os efeitos da relação enzima/substrato (E/S (Q)) e da interação entre os fatores pH e E/S influenciam muito pouco o processo na região estudada. Pode-se observar que com a diminuição do pH (L), há um aumento no grau de hidrólise. Quando aumenta-se a relação E/S, o grau de hidrólise também aumenta. O teste de t de Student para os efeitos E/S (Q) e interação pH x E/S revelou que estes parâmetros não influenciam significativamente ($p < 0,05$) o grau de hidrólise. O Anexo 3 apresenta o resultado do teste.

Uma Análise de Variância (ANOVA) ($p < 0,05$) foi realizada, retirando-se os efeitos não significativos. Foi possível obter um modelo quadrático para os resultados do planejamento fatorial. A Tabela 5.4 apresenta a Análise de Variância dos resultados obtidos no planejamento fatorial 2^2 da Proteinase 1.5L. Os cálculos são apresentados no Anexo 3.

Tabela 5.4: Tabela ANOVA – Proteinase 1.5L – Modelo Quadrático

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Número de graus de liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}	F _{calc} /F _{tab}
Regressão	63,98	3	21,33	65,21	4,35	14,99
Resíduos	2,29	7	0,33			
Total	66,27	10				

Verifica-se pela Tabela 5.4 que o modelo é preditivo na região estudada ($F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}} > 4$). O coeficiente de correlação (R^2) encontrado foi de 0,97, concluindo-se que trata-se de um bom ajuste.

O modelo matemático gerado com os coeficientes de regressão é apresentado na equação 5.4.2.1. Os cálculos estão apresentados no Anexo 2.

$$\text{DH (\%)} = 6,81 - 2,51 \times \text{pH} + 0,67 \times \text{pH}^2 + 1,17 \times \text{E/S} \quad (5.4.2.1)$$

onde as variáveis pH e E/S devem estar na forma codificada, utilizando-se a Tabela 4.2.

O modelo encontrado permite estimar o grau de hidrólise a partir das variáveis independentes, o pH e a relação E/S na região estudada, utilizando-se as variáveis na forma codificada (Tabela 4.2).

As Figuras 5.12 (a) e (b) apresentam a superfície de resposta e as curvas de contorno, respectivamente, das variáveis pH e E/S em relação ao grau de hidrólise, para Proteinase 1.5L. Observando-se a Figura 5.12 (b), pode-se concluir que a região de ótimo, isto é, a região onde houve um maior grau de hidrólise, está próxima do pH 6,6 a 6,7 e E/S 0,30 a 0,34%.

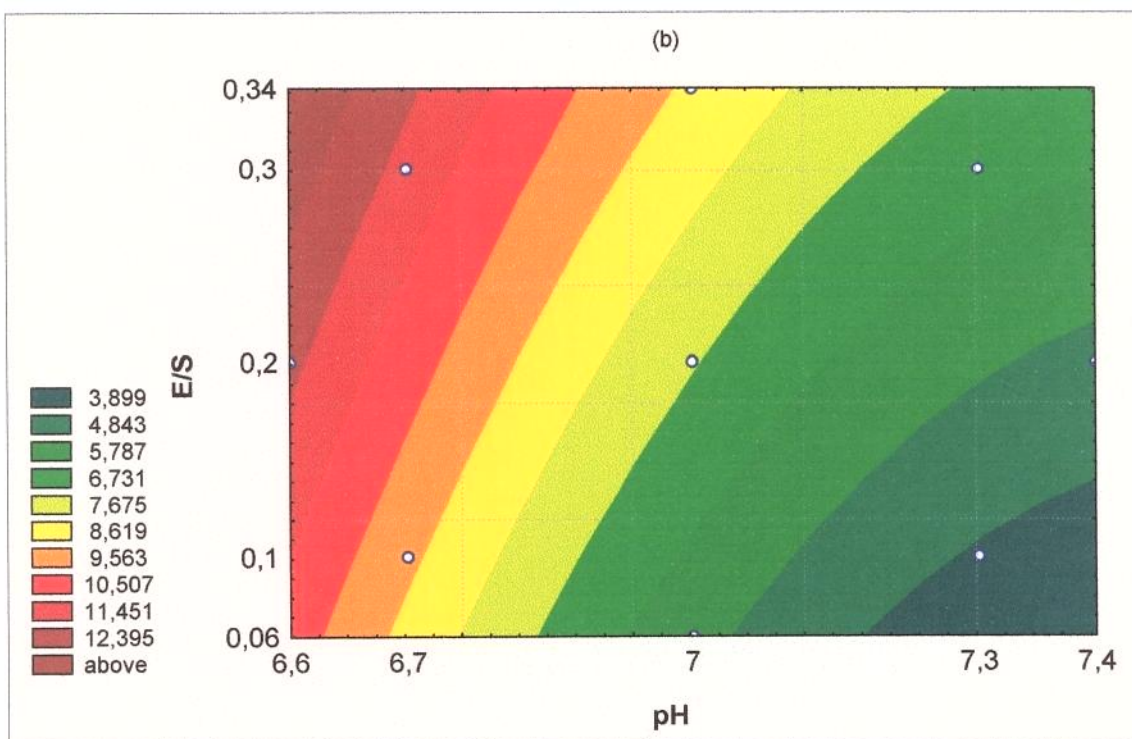
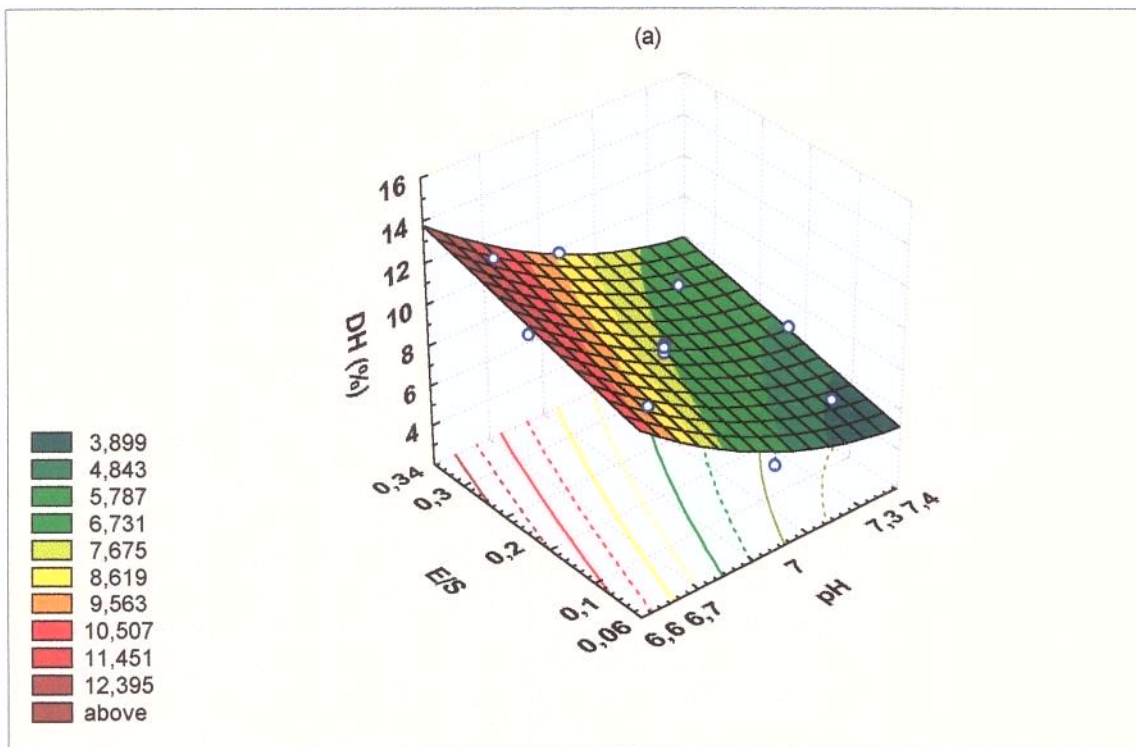


Figura 5.12: Superfície de Resposta (a) e Curvas de Contorno (b) para o estudo da influência do pH e da relação enzima substrato no grau de hidrólise com a enzima Proteinase 1.5L

5.4.3. Planejamento Experimental 2^3 – Savinase®

A Tabela 5.5 apresenta o Planejamento Experimental 2^3 para a hidrólise da carne escura de atum utilizando-se a enzima Savinase®. Os níveis das variáveis independentes estão descritos na Tabela 4.3.

**Tabela 5.5: Planejamento Experimental
 2^3 – Savinase®**

Ensaio	pH	T	E/S	DH (%)
1	-1	-1	-1	6,19
2	+1	-1	-1	7,24
3	-1	+1	-1	7,94
4	+1	+1	-1	9,23
5	-1	-1	+1	8,87
6	+1	-1	+1	9,72
7	-1	+1	+1	12,12
8	+1	+1	+1	12,25
9	0	0	0	9,13
10	0	0	0	9,43
11	0	0	0	9,44
12	$-\alpha$	0	0	8,22
13	$+\alpha$	0	0	12,02
14	0	$-\alpha$	0	6,99
15	0	$+\alpha$	0	11,34
16	0	0	$-\alpha$	6,62
17	0	0	$+\alpha$	10,60

A Figura 5.13 apresenta as curvas de hidrólise obtidas durante os 17 experimentos.

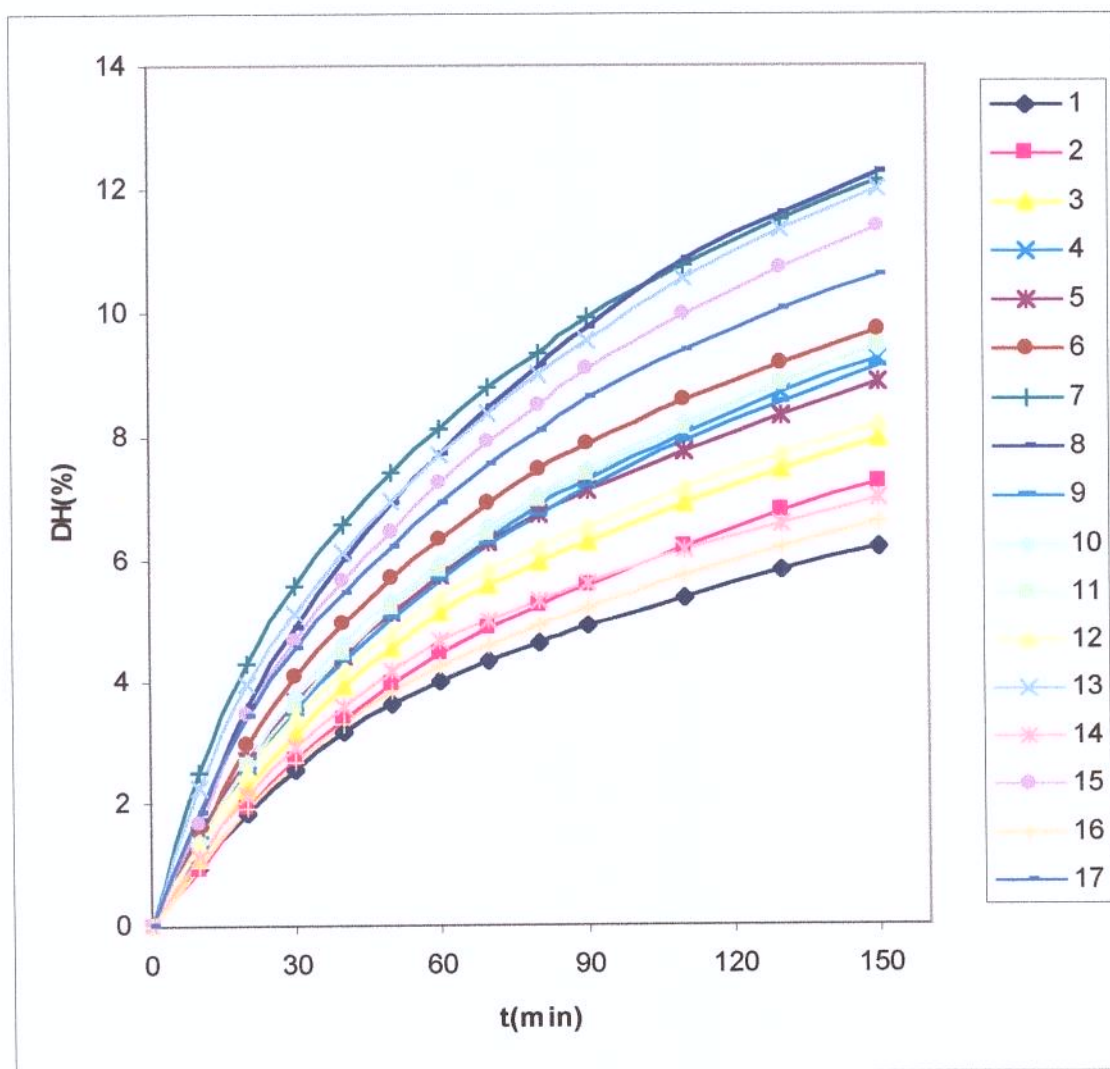


Figura 5.13: Hidrólise (DH%) da carne escura de atum utilizando Savinase® – Planejamento Experimental 2³

A Figura 5.14 apresenta os efeitos de três variáveis independentes, pH, temperatura e relação E/S, no grau de hidrólise da carne escura de atum.

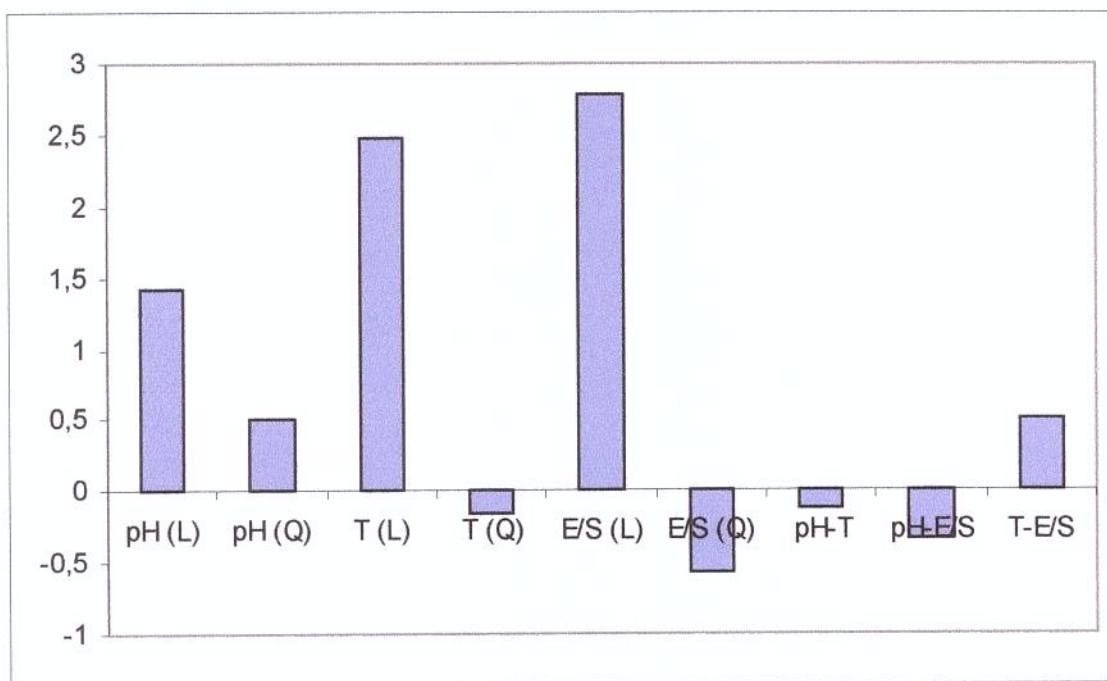


Figura 5.14: Efeitos do pH, temperatura (T) e relação E/S na hidrólise de carne escura de atum utilizando Savinase® (L=linear; Q=quadrático)

Pode-se observar pela Figura 5.14 que as três variáveis estudadas influenciam o grau de hidrólise. Através do Teste t de Student ($p < 0,05$) (Anexo 4), verificou-se que as variáveis que não influenciaram significativamente a reação na região estudada foram a temperatura (Q) e as interações entre as variáveis. A variável de maior efeito foi a relação enzima/substrato (E/S), seguida pela temperatura e o pH. Pode-se observar que houve um aumento do grau de hidrólise com o aumento do pH, temperatura e relação E/S.

Uma Análise de Variância (ANOVA) ($p < 0,05$) foi realizada, retirando-se os termos com efeitos não significativos (descritos acima). Um modelo quadrático foi ajustado para os dados. A Tabela 5.6 apresenta a Análise de Variância dos resultados obtidos no planejamento fatorial 2^3 da Savinase®. Os cálculos são apresentados no Anexo 4.

Tabela 5.6: Tabela ANOVA –Savinase® - Modelo Quadrático

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Número de graus de liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}	F _{calc} /F _{tab}
Regressão	56,66	5	11,33	38,75	3,20	12,11
Resíduos	3,22	11	0,29			
Total	59,88	16				

Verifica-se pela Tabela 5.6 que o modelo é preditivo na região estudada ($F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}} > 4$). O coeficiente de correlação (R^2) encontrado foi de 0,95, concluindo-se que trata-se de um bom ajuste.

O modelo matemático gerado com os coeficientes de regressão são apresentado na equação 5.4.3.1. Os cálculos estão apresentados no Anexo 3.

$$DH = 9,24 + 0,71 \times pH + 0,27 \times pH^2 + 1,24 \times T + 1,40 \times E/S - 0,26 \times E/S^2 \quad (5.4.3.1)$$

onde as variáveis pH, T e E/S devem estar na forma codificada, utilizando-se a Tabela 4.3.

As Figuras 5.15 (a) e (b), apresentam as superfícies de resposta e as curvas de contorno, respectivamente, das variáveis pH e temperatura em relação ao grau de hidrólise, para enzima Savinase®. Observando-se a Figura 5.15(b), pode-se concluir que a região de ótimo, isto é, a região onde houve um maior grau de hidrólise, está próxima do pH 9,4 a 9,5 e T de 52 a 53,4°C.

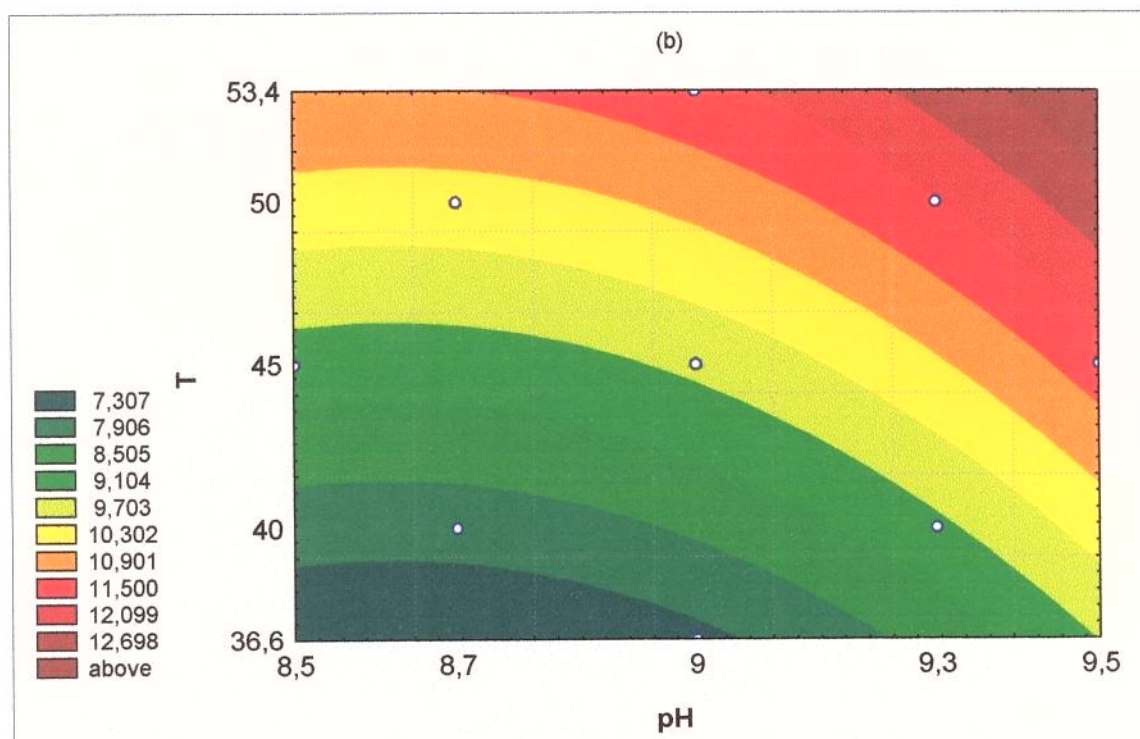
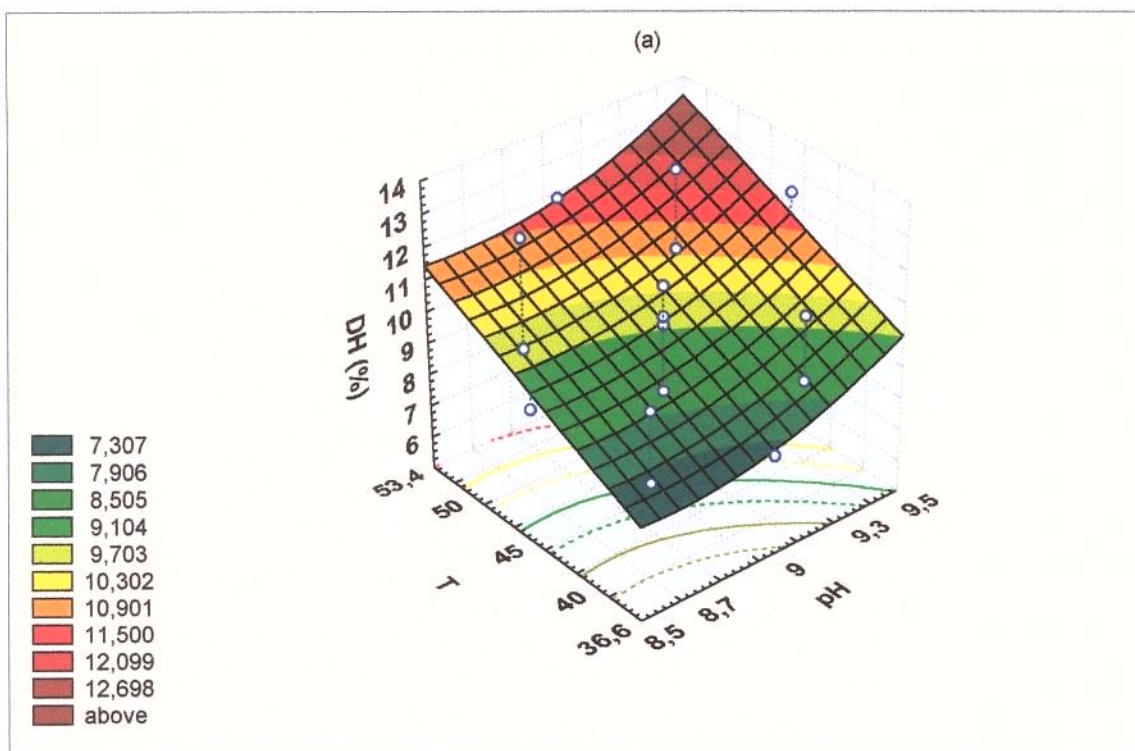


Figura 5.15: Superfície de Resposta (a) e Curvas de Contorno (b) para o estudo da influência do pH e da temperatura no grau de hidrólise com a enzima Savinase®

As Figuras 5.16 (a) e (b) apresentam as superfícies de resposta e as curvas de contorno, respectivamente, das variáveis pH e E/S em relação ao grau de hidrólise, para enzima Savinase®. Observando-se a Figura 5.16(b), pode-se concluir que a região de ótimo, isto é, a região onde houve um maior grau de hidrólise, está próxima do pH 9,4 a 9,5 e E/S de 0,28 a 0,37%.

As Figuras 5.17 (a) e (b) apresentam as superfícies de resposta e as curvas de contorno, respectivamente, das variáveis E/S e temperatura em relação ao grau de hidrólise, para enzima Savinase®. Observando-se a Figura 5.17(b), pode-se concluir que a região de ótimo, isto é, a região onde houve um maior grau de hidrólise, está próxima da temperatura de 52 a 53,4°C e E/S 0,28 a 0,37%.

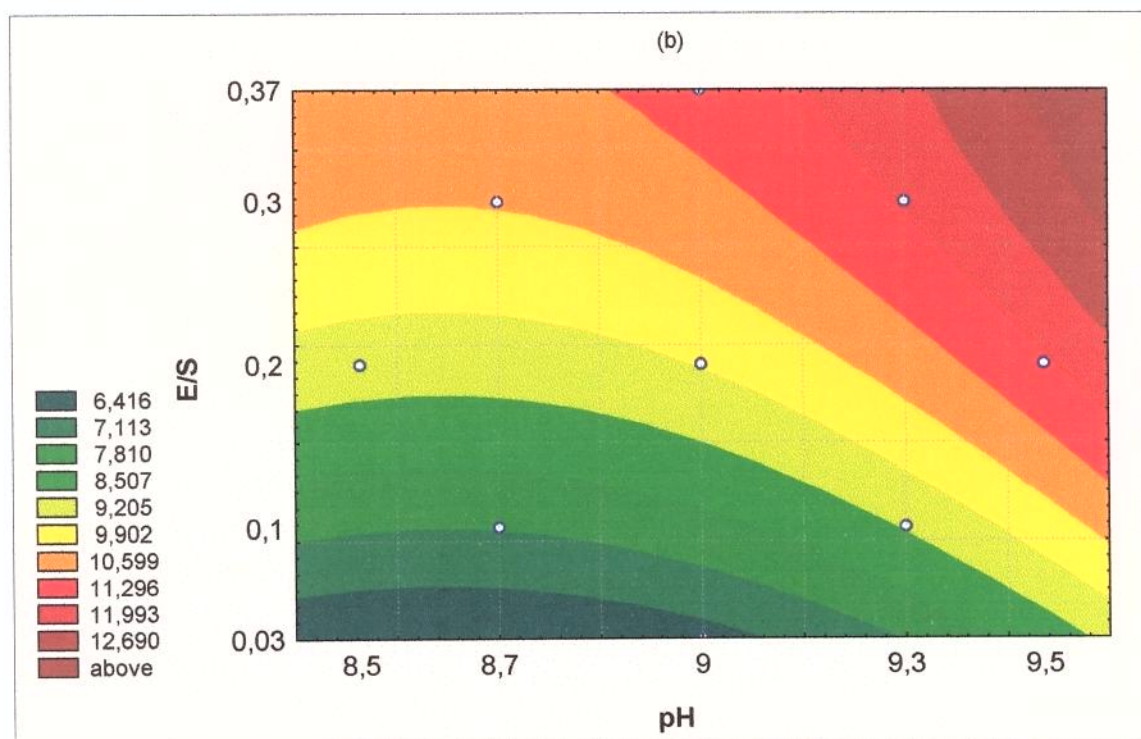
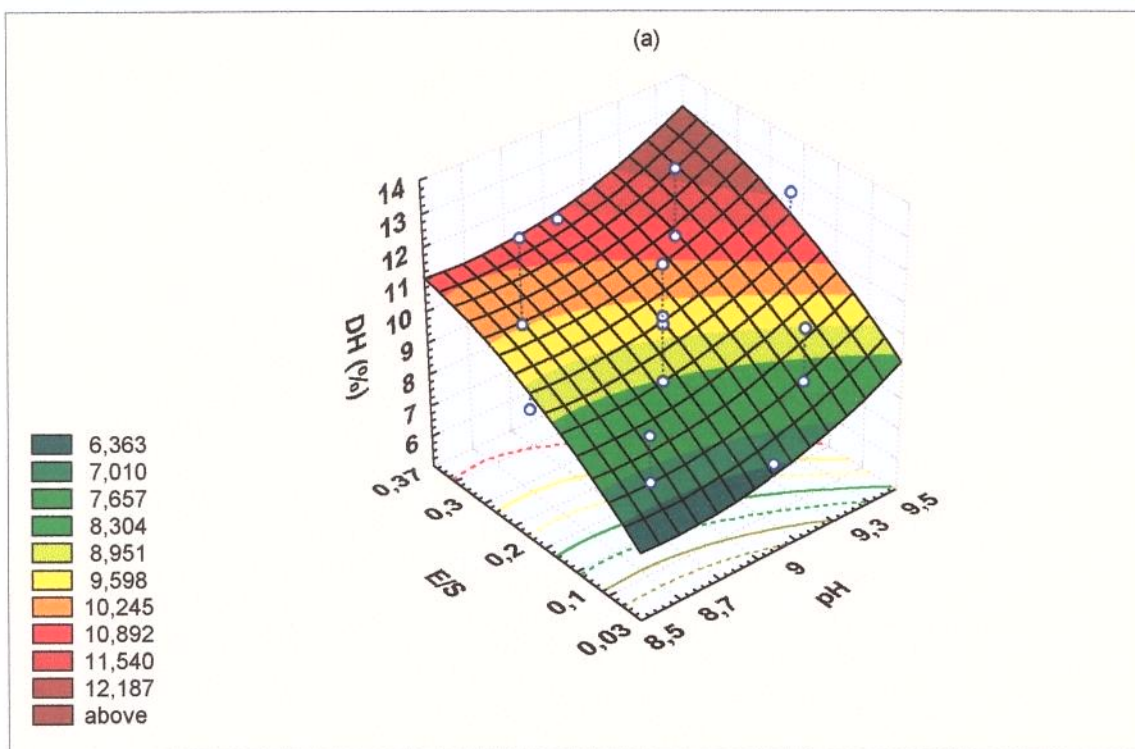


Figura 5.16: Superfície de Resposta (a) e Curvas de Contorno (b) para o estudo da influência do pH e da relação E/S no grau de hidrólise com a enzima Savinase®

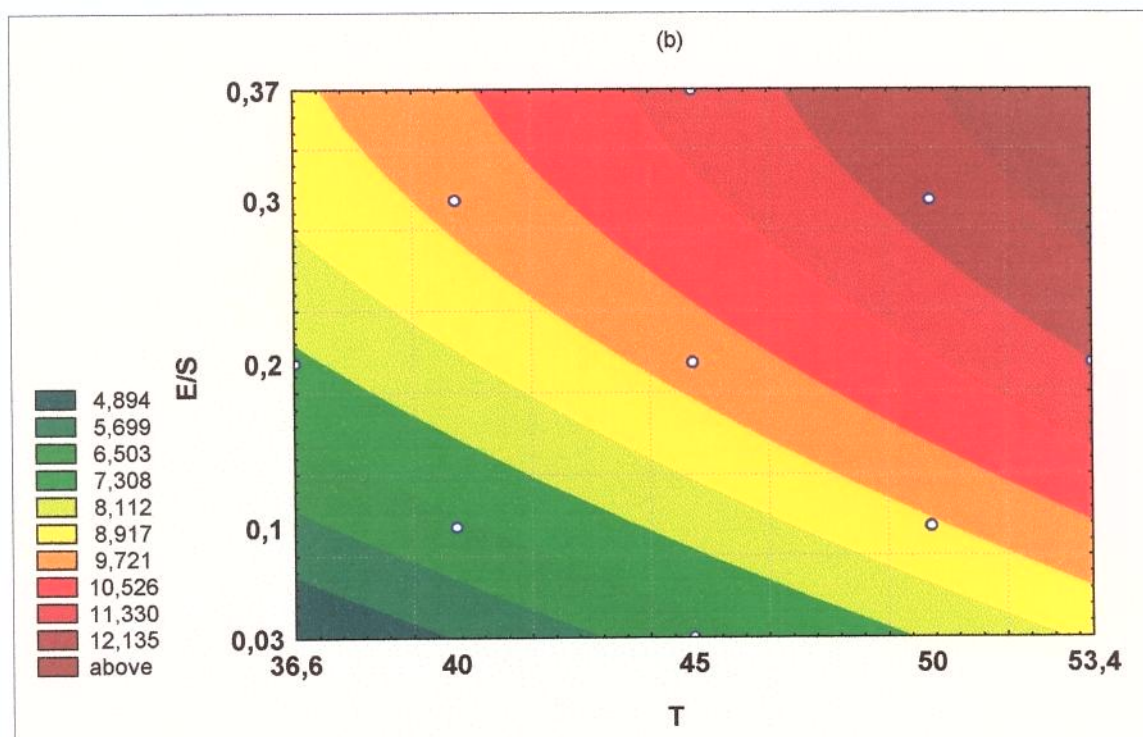
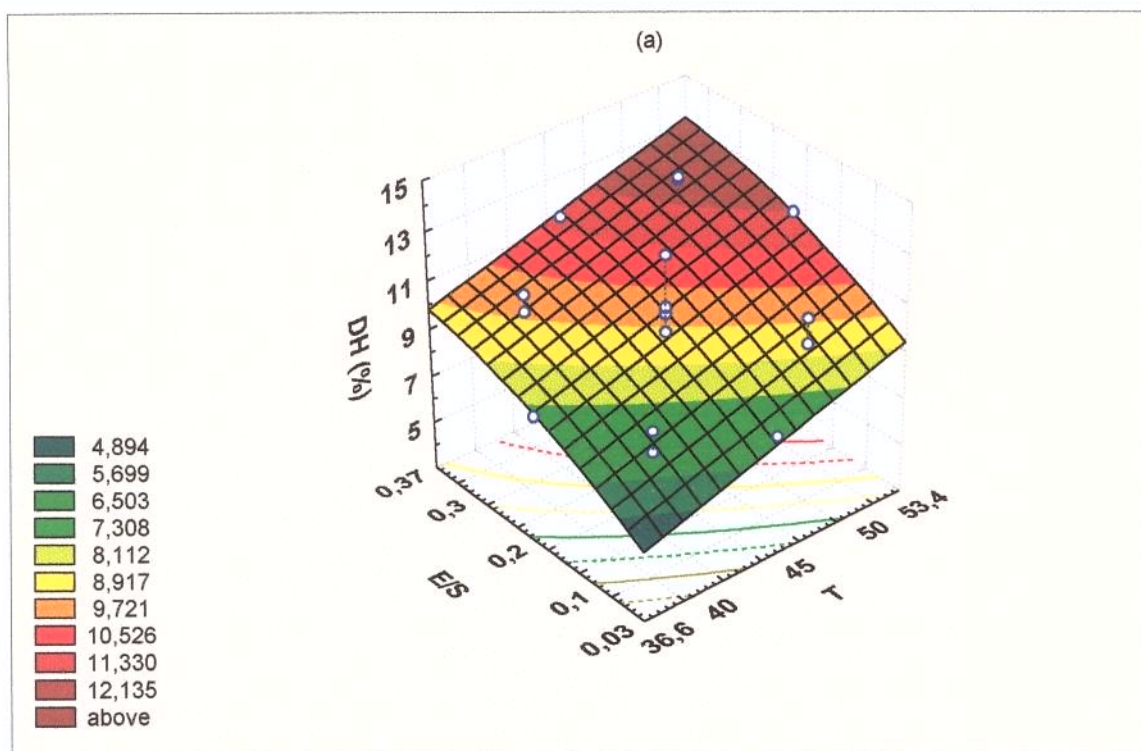


Figura 5.17: Superfície de Resposta (a) e Curvas de Contorno (b) para o estudo da influência da temperatura e da relação E/S no grau de hidrólise com a enzima Savinase®

5.4.4. Otimização dos Processos de Hidrólise

5.4.4.1. Proteinase 1.5L

A produção do hidrolisado protéico de carne escura de atum, utilizando-se a enzima Proteinase 1.5L, foi otimizada no ponto pH 6,577 e relação enzima substrato 0,341% ($-\alpha, +\alpha$), onde o modelo indica um grau de hidrólise máximo na região estudada.

5.4.4.2. Savinase®

A produção do hidrolisado protéico de carne escura de atum, utilizando-se a enzima Savinase®, foi otimizada no ponto pH 9,504, temperatura 53,4°C e relação enzima substrato 0,368% ($+\alpha, +\alpha, +\alpha$), onde o modelo indica um grau de hidrólise máximo na região estudada.

5.5. Validação dos Modelos

Após a otimização do processo de hidrólise, foi feita a validação dos modelos, isto é, comparou-se resultados obtidos através dos modelos matemáticos com resultados experimentais. Os pontos escolhidos foram os pontos nas condições que o produto seria produzido em escala maior, isto é, os pontos de maior grau de hidrólise. Para a Proteinase 1.5L, o ponto escolhido foi pH 6,6 e relação E/S 0,341. Para a Savinase®, o ponto escolhido foi pH 9,5, temperatura 53,4°C e relação E/S 0,368%.

A Tabela 5.7 apresenta os valores de grau de hidrólise obtidos experimentalmente e os previstos pelo modelo.

Tabela 5.7: Validação dos Modelos Matemáticos

	DH experimental (%)	DH previsto (%)
HP Proteinase 1.5L	12,44 ± 1,57	13,34
HP Savinase®	14,78 ± 0,53	14,91

Pode-se observar que no caso das duas enzimas a diferença entre o valor experimental e o valor previsto pelo modelo foi pequena, sendo 6,7 e 0,9%, para Proteinase 1.5L e Savinase®, respectivamente.

Os modelos matemáticos foram então validados nas regiões estudadas e a metodologia de superfície de resposta apresentou-se apropriada para este tipo de aplicação.

5.6. Caracterização dos Hidrolisados Protéicos

Os hidrolisados protéicos obtidos com as duas enzimas foram produzidos nas condições de pH, temperatura e relação enzima/substrato otimizadas (Item 5.4.4). Foram analisados composição centesimal, valor TBA, solubilidade, perfil eletroforético e composição de aminoácidos dos hidrolisados.

5.6.1. Composição Centesimal

A Tabela 5.8 apresenta a composição da carne escura de atum pré cozido, dos hidrolisados protéicos produzidos com a Proteinase 1.5L e com a Savinase®.

Tabela 5.8: Composição centesimal e relação NNP/NT dos hidrolisados protéicos de atum*

	Matéria-prima	HP Proteinase1.5L	HP Savinase®
Umidade (%)	64,63 ± 0,08	6,21 ± 0,00	6,56 ± 0,12
Proteína Bruta(%)	26,88 ± 0,25	66,09 ± 2,20	64,58 ± 1,32
Lipídios (%)	5,79 ± 0,05	17,59 ± 0,14	16,80 ± 0,32
Cinza (%)	1,85 ± 0,03	5,36 ± 0,20	10,12 ± 0,05
NNP/NT (%)	14,08	37,71	61,52

*carne escura cozida

BENJAKUL & MORRISSEY (1997) obtiveram um hidrolisado protéico de resíduos de merluza (*Merluccius productus*) utilizando Alcalase®, com 2,77% de umidade, 79,97% de proteína, 3,83% de lipídios e 13,44% de cinza. Comparando-se estes dados com os da Tabela 5.8, pode-se observar que os hidrolisados protéicos de carne escura de atum apresentaram menores quantidades de umidade, proteína e cinza e uma quantidade maior de lipídios.

YÁÑES et alii (1976) produziram um hidrolisado protéico de merluza (*Merluccius gayi*) contendo 2,3% de umidade, 63,4% de proteína e 1,8% de cinza. Os hidrolisados protéicos de carne escura de atum apresentaram resultados similares, havendo diferenças na umidade, que está relacionada com o método de secagem.

O hidrolisado protéico de resíduos de lagosta (*Panulirus spp.*) feito com protease fúngica (VIEIRA et alii, 1995) apresentou 5,0% de umidade, 78,0% de proteína, 10,8% de lipídios e 6,5% de cinza. A composição química dos hidrolisados protéicos de carne escura de atum está de acordo com estes da literatura.

O hidrolisado protéico produzido com a Savinase® apresentou uma quantidade maior de cinza, que deve ser devido a maior quantidade de NaOH adicionada, uma vez que o pH da reação foi maior (9,5), em relação ao da produção de hidrolisado com a Proteinase 1.5L (6,6).

A relação NNP/NT do hidrolisado protéico produzido com a Savinase® também apresentou um valor mais alto em relação ao produzido com a Proteinase 1.5L. Isto pode ter ocorrido devido a diferença na especificidade das enzimas, já que alguns aminoácidos que foram liberados pela reação, podem possuir quantidade maior de nitrogênio.

5.6.2. Determinação do Valor TBA

As quantidades de malonaldeído determinadas nos hidrolisados e na matéria-prima estão apresentadas na Tabela 5.9.

**Tabela 5.9: Malonaldeído dos Hidrolisados
Protéicos de atum**

	mg malonaldeído/1000g
Matéria-prima	347,56 ± 23,58a
HP Proteinase1.5L	962,20 ± 17,56b
HP Savinase®	354,20 ± 12,14a
Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05)	

Pode-se observar que houve uma grande diferença entre as quantidades de malonaldeído encontradas nos dois hidrolisados.

Observando a Tabela 5.9, pode-se concluir que não houve diferença significativa entre as quantidades de malonaldeído da matéria-prima e do hidrolisado protéico produzido com a Savinase®.

5.6.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

O perfil eletroforético das proteínas da matéria-prima e dos hidrolisados protéicos secos em secador de leite de jorro cônico e em estufa está apresentado na Figura 5.18. O cálculo do peso molecular das proteínas e peptídios foi realizado por Densitometria. Na matéria prima, pode-se observar a presença de três bandas bem definidas, com os seguintes pesos moleculares: 62,8 , 54,5 e 40,7 kDa, e uma banda difusa com 12,7 kDa.

Nos hidrolisados protéicos produzidos com a Proteinase 1.5L, houve o desaparecimento das bandas definidas da matéria prima e o aparecimento de bandas difusas. O hidrolisado seco em secador de leite de jorro apresentou peptídios com pesos moleculares de 30 e 10,9 kDa e o seco em estufa 30 e 9,5 kDa.

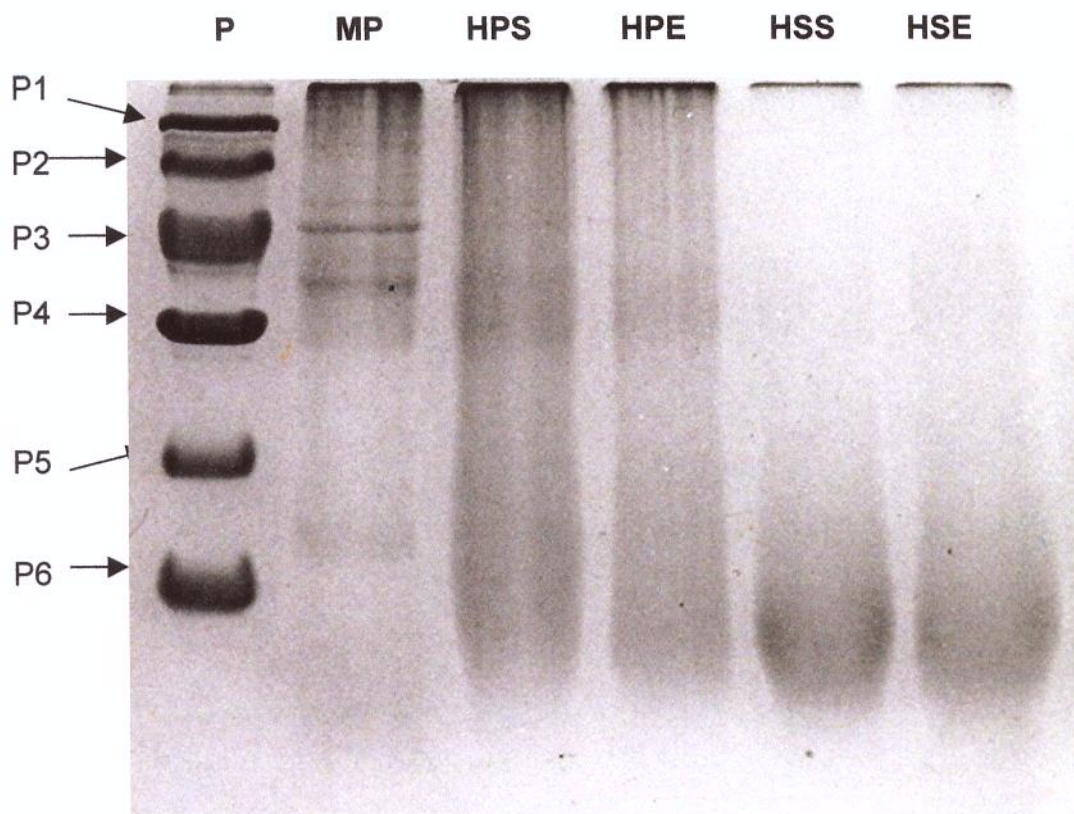


Figura 5.18: Eletroforese em gel de poliacrilamida

Onde: P=padrão; MP=matéria-prima, PS=hidrolisado protéico produzido com Proteinase 1.5L seco em secador de jorro, PE= hidrolisado protéico produzido com Proteinase 1.5L seco em estufa, SS=hidrolisado protéico produzido com Savinase® seco em secador de jorro, SE= hidrolisado protéico produzido com Savinase® seco em estufa; P1=fosforilase b (94kDa); P2=albumina (67kDa); P3=ovalbumina (43kDa); P4=anidrase (30kDa); P5=inibidor de tripsina (20,1kDa); P6= α -lactalbumina (14,4kDa).

Observando-se os hidrolisados produzidos com a Savinase®, verifica-se o desaparecimento de todas as bandas presentes na matéria prima e o aparecimento de bandas difusas de baixo peso molecular. O hidrolisado seco em secador apresentou peptídios com peso molecular de 9,7 kDa e o seco em estufa 8,9 kDa. Verificou-se que o processo de secagem não influenciou no perfil eletroforético dos hidrolisados protéicos produzidos com a Savinase®.

Em relação ao tipo de enzima utilizada, pode-se verificar que os hidrolisados protéicos produzidos com a Savinase®, apresentaram menor peso molecular.

5.6.4. Solubilidade

A Tabela 5.10 apresenta os valores de solubilidade obtidos para os dois métodos de secagem.

Tabela 5.10: Solubilidade dos hidrolisados protéicos de atum

Enzima	Método de Secagem	Solubilidade (%)
Proteinase 1.5L	Secador	$39,64 \pm 0,70^a$
Proteinase 1.5L	Estufa	$46,67 \pm 0,87b$
Savinase®	Secador	$75,25 \pm 1,45c$
Savinase®	Estufa	$76,56 \pm 0,66c$

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Pode-se observar que para o hidrolisado produzido com a Proteinase 1.5L, houve uma diferença significativa na solubilidade dos produtos secos por diferentes métodos de secagem. O produto seco em estufa apresentou uma maior solubilidade.

A solubilidade dos hidrolisados protéicos produzidos com a Savinase® secos em estufa e em secador de leite de jorro cônico não diferiu significativamente.

Comparando-se o tipo de enzima utilizada pode-se verificar que a Savinase®, deu origem a hidrolisados protéicos mais solúveis, em relação ao produzido com a Proteinase 1.5L. Isto pode ser confirmado, observando-se o perfil eletroforético dos hidrolisados (Figura 5.18), onde os produzidos com a Savinase®, apresentaram peptídios com menores pesos moleculares.

5.6.5. Determinação de Aminoácidos

A Tabela 5.11 apresenta a composição de aminoácidos dos hidrolisados protéicos de carne escura de atum produzidos com as enzimas Proteinase 1.5L e Savinase® secos em secador de leito de jorro cônico.

Tabela 5.11: Aminoácidos dos hidrolisados protéicos de carne escura de atum (g/100g de amostra seca)

Aminoácidos	HP Proteinase 1.5L	HP Savinase®
Ác. Aspártico	6,58	5,82
Treonina	3,19	2,86
Serina	2,76	2,49
Ác. Glutâmico	9,06	8,01
Prolina	2,83	2,49
Glicina	3,56	3,15
Alanina	1,12	3,74
Cistina	0,43	0,32
Valina	3,02	2,76
Metionina	1,72	1,33
Isoleucina	2,63	2,42
Leucina	5,36	4,83
Tirosina	2,44	2,17
Fenilalanina	2,88	2,55
Lisina	5,38	4,76
NH ₃	0,65	0,57
Histidina	3,41	2,99
Arginina	3,68	3,25

A quantidade de triptofano não foi determinada, pois este aminoácido foi destruído durante a hidrólise ácida, antes das amostras serem injetadas no equipamento.

Observando-se a Tabela 5.11 pode-se observar, que em geral, a composição de aminoácidos dos hidrolisados apresentou-se similar. O hidrolisado protéico obtido com a Proteinase 1.5L apresentou quantidades levemente maiores de todos os aminoácidos com exceção da alanina.

Comparando-se as quantidades de aminoácidos essenciais mínimas diárias sugeridas pela FAO/WHO (1973) com as quantidades presentes nos dois hidrolisados, pode-se verificar que em geral estão próximas.

VIEIRA et alii (1995) compararam hidrolisados protéicos de resíduos de lagosta obtidos através de três enzimas proteolíticas: papaína, pepsina e protease fúngica. O hidrolisado que apresentou teores mais elevados de aminoácidos totais foi o obtido com o uso da protease fúngica.

Diversos autores apresentaram a composição de hidrolisados protéicos de pescado (YÁÑEZ et alii, 1976; LALASIDIS et alii, 1978; REBECA et alii, 1991; YU & FAZIDAH, 1994; SHAHIDI et alii, 1994; SHAHIDI et alii, 1995; VIEIRA et alii, 1995; DINIZ & MARTIN, 1996; BENJAKUL & MORRISSEY, 1997). Os hidrolisados protéicos reportados apresentaram quantidades de aminoácidos similares com as dos hidrolisados protéicos de carne escura de atum.

Pode-se concluir que os hidrolisados protéicos produzidos com as enzimas Proteinase 1.5L e Savinase® poderão ser utilizados como fonte de proteínas, já que possuem os aminoácidos essenciais em concentrações similares às descritas pela FAO/WHO (1993). O aminoácido essencial limitante nos dois hidrolisados foi a metionina, já que apareceu em menores quantidades.

6. CONCLUSÕES

1. O processo de hidrólise enzimática da carne escura de atum, utilizando a enzima Proteinase 1.5L, apresentou um ótimo na região onde o pH variou de 6,6 a 6,7 e a relação enzima/substrato de 0,30 a 0,34%. O modelo matemático foi considerado preditivo na região estudada.
2. O processo de hidrólise enzimática da carne escura de atum, utilizando a enzima Savinase®, apresentou um ótimo na região onde o pH variou de 9,3 a 9,5, a temperatura de 50 a 53,4°C e a relação enzima/substrato de 0,30 a 0,37%. O modelo matemático foi considerado preditivo na região estudada.
3. A avaliação do grau de hidrólise da carne escura de atum, através do pH-stat (Mettler-Toledo DL-50 Graphix) mostrou-se bastante reprodutível nas condições de processo estudadas.
4. A enzima Proteinase 1.5L tem a vantagem adicional de não depender significativamente da temperatura na hidrólise enzimática da carne escura de atum na região estudada. Em processos industriais, temperaturas menores poderiam ser usadas, podendo haver uma economia de energia no processo de hidrólise.
5. O método de secagem para a produção do hidrolisado protéico de carne escura de atum produzido com a Proteinase 1.5L, influenciou na solubilidade do produto final. O produto com maior solubilidade foi obtido através da secagem em estufa.
6. O método de secagem para a produção do hidrolisado protéico de carne escura de atum produzido com a Savinase® não influenciou na solubilidade do produto final.

7. Houve elevada quantidade de malonaldeído tanto no resíduo “in natura” como no hidrolisado protéico devido, provavelmente à pré cocção, congelamento e descongelamento da matéria prima utilizada.
8. Os hidrolisados protéicos de carne escura de atum apresentaram teor protéico e perfil aminoacídico superiores aos da matéria-prima, constituindo-se em ingredientes alimentares alternativos, propiciando o aproveitamento dos resíduos da indústria processadora de atum enlatado.
9. Uma sugestão para estudos posteriores seria a utilização de hidrolisados protéicos de carne escura de atum, para a produção de rações para peixes, já que possuem um alto teor protéico e os peixes são atraídos por aminoácidos livres. Para tanto, não seria necessária a etapa de secagem, pois a ração ainda seria extrusada ou misturada com outros ingredientes.
10. Outra sugestão seria a utilização de outros resíduos da indústria processadora de atum, como cabeça, vísceras e cauda, para a produção de hidrolisado protéico de pescado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER-NISSEN, J. Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins. **Process Biochemistry**, 12, 6, 18-23, Jul/Aug, 1977.
- ADLER-NISSEN, J. Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 27, 6, 1256-1262, 1979.
- ADLER-NISSEN, J. Control of Bitterness in Proteolytic Reaction and of the Level of Bitterness in Protein Hydrolysis Processes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 34B, 215-222, 1984.
- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic Hydrolysis of Food Proteins**. Barking, U.K.: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. 427p.
- ANÔNIMO. 1978. Hydrolysis of Food Protein in the Laboratory, a Laboratory Procedure, IB 102e. GB. Bagsvaerd, Denmark: Novo Industri A/S. *Apud*: **International Journal of Food Science and Technology**, 31, 419-426, 1996.
- A.O.A.C. **Official Methods of Analysis**. 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. 1980.
- BAEK, H.H.; CADWALLADER, R.K. Enzymatic Hydrolysis of Crayfish Processing By-products. **Journal of Food Science**, 60, 5, 929-935, 1995.
- BENJAKUL, S.; MORRISEY, M.T. Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 45, 3423-3430, 1997.
- BERGE, G. M.; STOREBAKKEN, T. Fish Protein hydrolysate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. **Aquaculture**, 145, 205-212, 1996.

- BIMBO, A. P.; CROWTHER, J. B. Fish meal and oil: current uses. **Journal of American Oil Chemical Society**, Chicago, 69, 3, 221-7, 1992.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiology**, 37: 911-917, 1959.
- BOSTOCK, T.; MONTAÑO, R. Produccion de galletas enriquecidas com proteina de pescado. In: **Suplemento al informe de la consulta de expertos sobre tecnologia de productos pesqueros en America Latina**. Ciudad de Mexico: FAO Informe de Pesca nº340, 1983. 65-69.
- BRAZIL TREND'99. **Datamark**, 1999. S.n.t.
- CÂNDIDO, L.M.B. **Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de Tilápia do Nilo (*Oreochromus niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcionais**. Campinas, 1998. 207p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- CARVALHO, A.P.; ESCAFFRE, A.M.; OLIVA TELES, A.; BERGOT, P. First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. **Aquaculture International**, 5, 361-367, 1997.
- CHAKRABARTI, R. A method of Debittering Fish Protein Hydrolysate. **Journal of Food Science and Technology**, 20, 154-156, July/Aug., 1983.
- CHEFTEL, C.; AHERN, M.; WANG, D.I.C.; TANNENBAUM, S.R. Enzymatic Solubilization of Fish Protein Concentrate: Batch Studies Applicable to Continuous Enzyme Recycling Processes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 19, 1, 155-161, 1971.
- CONTRERAS-GUZMÁN, E. S. **Bioquímica de Pescados e Derivados**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 409p.

- CRISTIANINI, M. **Estudo da distribuição de temperaturas durante o processo de esterilização de atum (*Katsuwonus pelamis*) em bolsa flexível**. Campinas, 1998. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Edible packing films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional Properties. **Journal of Food Science**, 60 ,6, 1369-1374, 1995.
- DINIZ, F.M.; MARTIN, A.M. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. **International Journal of Food Science and Technology**, 31, 419-426, 1996.
- DINIZ, F.M.; MARTIN, A.M. Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of Shark Protein Hydrolysate. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, 30, 3, 266-272, 1997.
- DINIZ, F.M.; MARTIN, A.M. Hidrolisado Protéico de Pescado. In: OGAWA, M.; MAIA, E.L. **Manual de Pesca: Ciência e Tecnologia do Pescado**. Livraria Varela, 1999. I, 360-365.
- DISNEY, J. G; HOFFMAN, A. Development of a fish silage/carbohydrate animal feed for use in the tropics. **Tropical Science**. London. 20, 2, 129-144, 1978.
- DUNN, B.M. Determination of protease mechanism. In: BEYNON, R.J.; BOND, J.S. **Proteolytic Enzymes**. Oxford: Oxford University Press, 1990. 4: 57-81.
- ESPÍNDOLA FILHO, A. ; OETTERER, M.; TRANI, P.E. Processamento Agroindustrial de Resíduos de Peixes, Camarões, Mexilhões e Ostras pelo Sistema Cooperativado. In: **Seminário e Workshop “Tecnologia para Aproveitamento Integral do Pescado”**, Campinas, 2000. 4-6.

- ESPÍNDOLA FILHO, A. ; OETTERER, M.; TRANI, P. E. Aproveitamento de Resíduos Sólidos de Pescado como Fertilizante Orgânico Marinho. In: **Seminário e Workshop “Tecnologia para Aproveitamento Integral do Pescado”**, Campinas, 2000. 7-12.
- FAO/WHO **Energy and Protein Requirements**. Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations. 1973. P.63.
- FROKJAER, S. Use of Hydrolysates for Protein Supplementation. **Food Technology**, 86-88, Oct., 1994.
- GILDBERG, A. Enzymic Processing of Marine Raw Materials. **Process Biochemistry**, 28, 1-15, 1993.
- GREEN, J.H.; MATTICK, J. F. Possible methods for the utilization or disposal of fishery solid wastes. **Journal of Food Quality**, v. 1, p. 229-251, 1977.
- HALE, M.B. Relative activities of commercially available enzymes in the hydrolysis of fish proteins. **Food Technology**, 23, 1, 107-110, 1969.
- HAMZA-CHAFFAI, A. Effect of Manufacturing Conditions on Rheology of Banana Gelified Milk: Optimization of the Tecnology. **Journal of Food Science**, 55, 6, 1630-1633, 1990.
- HOOD, L. F.; ZALL, R. R. Recovery, utilization and treatment of seafood processing wastes. **Advance Fish Science and Technology**, Fishing News, Aberdeen. 355-61, 1979.
- HOYLE, N. T.; MERRITT, J. H. Qualtiy of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, 59, 1, 76-79, 1994.
- IADEROZA, M.; BALDINI, V.L.S. Ênzimos e a qualidade de vegetais processados. **Manual Técnico ITAL**. Campinas, 1991. 43-51.

- JONES, H.R. **Pollution control in meat, poultry and seafood processing**. New Jersey, Noyes, 215-246, 1974.
- JOHNSON, T.M.; ZABIK, M.E. Response Surface Methodology for Analysis of Proetin Interactions in Angel Food Cakes. **Journal of Food Science**, 46, 1226-1230, 1981.
- KELLEHER, S.D.; SILVA, L.A.; HULTIN, H.O.; WILHELM, K.A. Inhibition of lipid oxidation during processing of washed, minced Atlantic mackerel. **Journal of Food Science**, 57, 1103-1108, 1119, 1992.
- KELLEHER, S.D.; HULTIN, H.O.; WILHELM, K. A. Stability of Mackerel Surimi Prepared under Lipid-Stabilizing Processing Conditions. **Journal of Food Science**, 59, 2, 269-271, 1994.
- KINSELLA, J.E. Functional Properties of Proteins in Foods: A Survey. **Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, Boca Raton, 7, 4, 219-280, 1976.
- KINSELLA, J.E. Functional Properties of Soy Proteins. **Journal of American Oil Chemists' Society**, 56, 242-258, Mar., 1979.
- KOLLENGODE, A.N.R.; HANNA, M.A.; CUPPET, S. Volatiles Retention as Influenced by Method of Addition during Extrusion Cooking. **Journal of Food Science**, 61, 5, 985-989, 1996.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, 227, 680-685, 1970.
- LAHL, W.J.; BRAUN, S.D. Enzymatic Production of Protein Hydrolysates for Food Use. **Food Technology**, 68-71, Oct., 1994.
- LALASIDIS, G.; BOSTRÖM, S.; SJÖBERG, L. Low Molecular Weight Enzymic Fish Protein Hydrolysates: Chemical Composition and Nutritive Value.. **J. Agric. Food Chem.**, 26, 3, 751-756, 1978.

- LEES, R. **Manual de análises de alimentos** (Laboratory handbook of methods of food analysis). Zaragoza, Ed. Acribia. p.124-125, 1979.
- LEHNINGER, A.L. Enzimas. In: **Princípios de Bioquímica**. Trad. W.R. LODI; A.A. SIMÕES. São Paulo: Sarvier, 1984, capítulo 9: 153-181.
- LISTON, J. Avanços na tecnologia de pescados para melhor aproveitamento de espécies industrializadas de baixo valor comercial. **Boletim do ITAL**, Campinas, São Paulo, 53, 1-20, set./out., 1977.
- LÖFFLER, A. Proteolytic enzymes: sources and applications. **Food Technology**, 40, 1, 63-70, 1986.
- LUSTOSA NETO, A. D. **Elaboração e caracterização química funcional e nutricional de ensilados de resíduos de pescado da família *Lutjanidae***. Fortaleza, 1994. 77p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Ceará.
- MACEDO, M.V. de A. A retomada do desenvolvimento do setor pesqueiro nacional. Brasília, Grupo Executivo do Setor Pesqueiro (GESPE), 1996.
- MACKIE, I.M. Fish protein hydrolysate. **Process Biochemistry**, 17, 1, 29-31, 1982.
- MAIA, Jr., W.M. **Adequação do processamento de silagens de resíduos de tilápia, caracterização dos lipídeos e da fração seca em pó**. João Pessoa, 1998. 116p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Paraíba.
- MARQUES, M.C. **Avaliação do desenvolvimento da oxidação lipídica em filés e hambúrgueres de pacu (*Colossoma mitrei*) armazenados sob congelamento e seu efeito na funcionalidade das proteínas**. Campinas, 2000. 186p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

- MARTIN, A. M.; PATEL, T. Bioconversion of wastes from marine organism. In: MARTIN, A. M. (Ed) **Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products**. London: Elsevier Science Publishers, 1991, 14: 417-440.
- McCOMIS, W. T.; LITCHFIELD, J.H. Meat, fish, and poultry processing wastes. **Journal of Water Pollution Control Federation**, 57, 6, 570-573, June, 1985.
- MORAIS, C. & MARTINS, J. Considerações sobre o aproveitamento de sobras da industrialização de pescado na elaboração de produtos alimentícios. **Boletim do ITAL**, Campinas, São Paulo, 18, 3, 253-81, jul./set., 1981.
- MORALES-ULLOA, D. F. **Bioconversão de resíduos da indústria pesqueira**. Piracicaba, 1994. 112p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade Estadual de São Paulo.
- MORR, C.V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E.; REGENSTEIN, J.M.; VAN BUREN, J.P.; KILARA, A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, 50, 1715-1718, 1985.
- NEURATH, H. The Diversity of Proteolytic Enzymes. In: In: BEYNON, R.J.; BOND, J.S. **Proteolytic Enzymes**. Oxford: Oxford University Press, 1990. 1: 1-12.
- NUNES, M. L. Resíduos de pescado: aproveitamento sob a forma de silagem. In **XIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, **Anais**. Soc. Bras. Cienc.Tec.Alim. p 137, 1992.
- OETTERER, M. Produção de silagem a partir da biomassa residual de pescado. **Alimentos e Nutrição**, 5, 119-134, 1993/94.

- OUTTRUP, H.; BOYCE, C.O.L. Microbial Proteinases and Biotechnology. In: FORGARTY, W.M.; KELLY, C.T. **Microbial Enzymes and Biotechnology** 2nd Edition. Barking: Elsevier Science Publishers Ltd, 1990, 6: 227-224.
- OWENS, J.D.; MENDONZA, L.S. Enzymatically hydrolysed and bacterially fermented fishery products. **Journal of Food Technology**, 20, 273-293, 1985.
- PIGOTT, G.M. Enzyme Modifications of Fishery By-Products. In: **Chemistry & Biochemistry of Marine Food Products**. Westport: Avi Publishing Company, 1982, 22: 447-452.
- POLGÁR, L. **Mechanisms of Protease Action**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 223p.
- QUAGLIA, G. B.; ORBAN, E. Enzymic solubilisation of proteins of sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 38, 3, 263-269, 1987.
- QUAGLIA, G. B.; ORBAN, E. Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from sardine (*Sardina pilchardus*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 38, 3, 271-276, 1987.
- QUAGLIA, G. B.; ORBAN, E. Influence of the Enzymatic Hydrolysis on Structure and Emulsifying Properties of Sardine (*Sardina pilchardus*). **Journal of Food Science**, 55, 6, 1571-1573, 1619, 1990.
- REBECA, B.D.; PEÑA-VERA, M.T.; DIAZ-CASTAÑEDA, M. Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases; yield and nutritional value. **Journal of Food Science**, 56, 2, 309-314, 1991.
- REGENSTEIN, J.M.; REGENSTEIN, C.E. **Introduction to Fish Technology**. New York: An Osprey Book, 1991.

- ROCHA, R.G.A. Aspectos de Processos Industriais e Variações de Aproveitamento de Recursos Pesqueiro ou Correlatos. In: **Seminário e Workshop “Tecnologia para Aproveitamento Integral do Pescado”**, Campinas, 2000. P. 88-92.
- RODRIGUES, A. M. C. **Obtenção da suspensão protéica de peixe e secagem em leito de jorro**. Campinas, 2000. 148p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- ROUSELL, L.; VIEILLE, A.; BILLET, I.; CHEFTEL, J.C. Sequential heat gelatinization of corn starch in an extrusion reactor. Optimization for a Maximum Dextrose Equivalent. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, 24, 449-458, 1991.
- SANTOS, 1994. *Apud*: CRISTIANINI, M. **Estudo da Distribuição de Temperaturas durante o processo de esterilização de atum (*Katsuwonus pelamis*) em bolsa flexível**. Campinas, 1998. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- SATHE, S.K.; SALLUNKE, D.K. Functional properties of the Great Northern Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Proteins: Emulsion, Foaming, Viscosity, and Gelation Properties. **Journal of Food Science**, 46, 71-74, 81, 1981.
- SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. **Boletim da SBCTA**, 32, 1, 105-126, jan./ago., 1998.
- SHAHIDI, F.; HAN, X.Q.; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, Barking, 53, 3, 285-293, 1995.

- SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J.; BALEJKO, J. Proteolytic hydrolysis of muscle of harp seal (*Phoca groenlandica*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, 42, 11, 2634-2638, nov., 1994.
- SPACKMAN, D.C.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 30, 1190-1206, 1958.
- STANSBY, M. E. Proximate composition of fish – proteins and general composition. In: HEEN, E.; KREUTZER, R. **Fish in Nutrition**,. London: Fishing News Books, 1962, 55-56.
- SUBASHINGHE, S. Innovative and value-added tuna products and markets. **INFOFISH International**, 1, 43-50, 1996.
- SUZUKI, T. Characteristics of fish and fish protein. In: **Fish and Krill Protein**. London: Applied Science Publishers Ltd., 1981. Cap. 1: 1-56.
- TARKY, W.; AGARWALA, O.P.; PIGOTT, G.M. Protein hydrolysate from fish waste. **Journal of Food Science**, 38, 917-918, 1973.
- TARLADGIS, B.G.; WATTS, B.M.; YOUNATHAN, M.T. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. **Journal of American Oil Chemists' Society**, 37, 1, 44-48, 1960.
- TEIXEIRA, C.G. Produtos alimentícios da atividade pesqueira. **Higiene Alimentar**, 7, 28, 24-26, 1933.
- TROUT, G. R. Techniques for measuring water-binding capacity in muscle foods – A Review of Methodology. **Meat Science**, 23, 235-252, 1988.

- VALÉRIO, A.C.R. **Elaboração de silagem enzimática de pescado como alternativa ao processo tradicional**. Piracicaba, 1994. 101p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade Estadual de São Paulo.
- VENUGOPAL, V. Production of fish protein hydrolysates by microorganisms. In: MARTIN, A.M. **Fisheries Processing: Biotechnological Applications**. London: Chapman & Hall, 1994. 10: 223-243.
- VENUGOPAL, V. Methods for Processing and Utilization of Low Cost Fishes: A Critical Appraisal. **Journal of Food Science and Technology** , 32, 1, 1-12, 1995.
- VENUGOPAL, V.; LEWIS, N.F. Isolation of proteins from low priced fish. **Fleischwirtschaft**, 61, 1368-1370, 1981.
- VIEIRA, G.H.F.; MARTIN, A.M.; SAKER-SAMPAIAO, S.; OMAR, S.; GONCALVES; R.C.F. Studies on the enzymatic hydrolysis of Brazilian Lobster (*Panulirus* spp) processing wastes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 69, 61-65, 1995.
- VIEIRA, G.H.F.; MARTIN, A.M.; SAKER-SAMPAIAO, S.; SOBREIRA-ROCHA, C.A.; GONCALVES; R.C.F. Production of Protein Hydrolysate from Lobster (*Panulirus* spp). In: CHARALAMBOUS, G. **Food Flavours: Generation, Analysis and Process Influence**. Amesterdam: Elsevier Science Publishers B V, 1405-1415, 1995.
- YÁÑEZ, E.; BALLESTER, D.; MONCKEBERG, F. Enzymatic fish protein hydrolysate: chemical composition, nutritive value and use as a supplement to cereal protein. **Journal of Food Science**, 41, 6, 1289-1292.
- YU, S.Y.; FAZIDAH, S. Enzymic hydrolysis of proteins from *Aristichthys nobilis* by protease P ‘Amano’ 3. **Tropical Science**, 34, 381-386, 1994.

WHITAKER, J. R. The Proteolytic Enzymes. In: **Principles of enzymology for the food sciences**. 2nd Edition. New York: Marcel Dekker, Inc., 1994. 19: 469-498.

WINDSOR, M.; BARLOW, S. **Introducion a los subproductos de pesquería**. Zaragoza: Acribia, 1984. 204p.

8. ANEXOS

ANEXO 1

Cálculo da Atividade Proteolítica

Enzima	Conc. (mg/ml)	Abs. (280nm)	Conc.(ug/ml)
Protease	2	1,0017	160,6452
Protease	2	0,9840	157,7903
Savinase	2	1,7732	285,0806
Savinase	2	1,7163	275,9032
Protease	0,1	0,3613	57,3548
Protease	0,1	0,3544	56,2419
Protease	0,2	1,0017	160,6452
Protease	0,2	0,9840	157,7903
Savinase	0,1	1,0596	169,9839
Savinase	0,1	1,0313	165,4194
Savinase	0,2	1,7732	285,0806
Savinase	0,2	1,7163	275,9032
Savinase	0,05	0,6811	108,9355
Savinase	0,05	0,6633	106,0645
Savinase	0,03	0,3663	58,1613
Savinase	0,03	0,3571	56,6774
Savinase	0,01	0,0665	9,8065
Savinase	0,01	0,0684	10,1129

ANEXO 2

Planejamento Experimental 2³ – Proteinase 1.5L

Cálculo dos Efeitos do pH (1), temperatura (2) e relação E/S (3)

Planilha gerada pelo software STATISTICA

Effect Estimates; Var.:VAR4; R-sqr=,36624; Adj.,09463

3 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,8857333

DV: VAR4

		Std.Err.			-95,%	+95,%		Std.Err.	-95,%	+95,%
	Effect	Pure Err	t(2)	p	Cnf.Limt	Cnf.Limt	Coeff.	Coeff.	Cnf.Limt	Cnf.Limt
Mean/Interc.	7,3055	0,2838	25,7450	0,0015	6,0845	8,5264	7,3055	0,2838	6,0845	8,5264
pH	-1,315	0,6655	-1,9760	0,1868	-4,1783	1,5483	-0,6575	0,3327	-2,0892	0,7742
T	-0,57	0,6655	-0,8565	0,4820	-3,4333	2,2933	-0,2850	0,3327	-1,7167	1,1467
E/S	0,89	0,6655	1,3374	0,3129	-1,9733	3,7533	0,4450	0,3327	-0,9867	1,8767

ANEXO 3

Planejamento Experimental Completo 2² – Proteinase 1.5L

- Cálculo dos Efeitos do pH (1) e relação E/S (2)

Effect Estimates; Var.:VAR3; R-sqr=,97628; Adj.:95255

2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,0612572

DV: VAR3

	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95, Cnf.Limt	+95, Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95, Cnf.Limt	+95, Cnf.Limt
Mean/Int.	6,9360	0,1429	48,5399	0,0004	6,3212	7,5509	6,9360	0,1429	6,3212	7,5509
pH (L)	-5,0207	0,1753	-28,6452	0,0012	-5,7748	-4,2665	-2,5103	0,0876	-2,8874	-2,1333
pH (Q)	1,2657	0,2091	6,0517	0,0262	0,3658	2,1656	0,6328	0,1046	0,1829	1,0828
E/S (L)	2,3442	0,1753	13,3747	0,0055	1,5901	3,0983	1,1721	0,0876	0,7950	1,5492
E/S (Q)	-0,2634	0,2091	-1,2595	0,3349	-1,1633	0,6365	-0,1317	0,1046	-0,5816	0,3182
pH-E/S	-0,7873	0,2475	-3,1810	0,0862	-1,8522	0,2776	-0,3937	0,1238	-0,9261	0,1388

- Tabela ANOVA (ignorando efeitos não significativos)

ANOVA; Var.:VAR3; R-sqr=,96546; Adj.:95065 (prot.sta)

2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,0612572

DV: VAR3

	SS	df	MS	F	p
(1)VAR1(L)	50,2644	1	50,2644	820,5468	0,0012
VAR1(Q)	2,7579	1	2,7579	45,0218	0,0215
(2)VAR2(L)	10,9579	1	10,9579	178,8836	0,0055
Lack of Fit	2,1667	5	0,4333	7,0741	0,1285
Pure Error	0,1225	2	0,0613		
Total SS	66,2694	10			

- Coeficientes de Regressão

Regr. Coefficients; Var.:VAR3; R-sqr=,96546; Adj.:95065

2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,0612572

DV: VAR3

	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95, Cnf.Limt	+95, Cnf.Limt
Mean/Interc.	6,812714	0,1040688	65,4635	0,00023	6,36494	7,26049
(1)VAR1(L)	-2,51034	0,0876356	-28,645	0,00122	-2,8874	-2,1333
VAR1(Q)	0,671216	0,1000347	6,70983	0,0215	0,2408	1,10163
(2)VAR2 (L)	1,172103	0,0876356	13,3747	0,00554	0,79504	1,54917

ANEXO 4

Planejamento Experimental Completo 2² -Savinase®

- Cálculo dos Efeitos do pH (1), temperatura (2) e relação E/S (3)

Effect Estimates; Var.:VAR4; R-sqr=,96022; Adj.:90909										
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Pure Error=,0316927										
DV: VAR4										
		Std.Err.			-95,%	+95,%		Std.Err.	-95,%	+95,%
	Effect	Pure Err	t(2)	p	Cnf.Limt	Cnf.Limt	Coeff.	Coeff.	Cnf.Limt	Cnf.Limt
Mean/Int.	9,34011	0,10257	91,06382	0,00012	8,89880	9,78142	9,34011	0,10257	8,89880	9,78142
(1)pH(L)	1,42124	0,09639	14,74486	0,00457	1,00651	1,83596	0,71062	0,04819	0,50326	0,91798
pH(Q)	0,50816	0,10619	4,78542	0,04100	0,05126	0,96506	0,25408	0,05309	0,02563	0,48253
(2)T(L)	2,47641	0,09639	25,69195	0,00151	2,06169	2,89114	1,23821	0,04819	1,03084	1,44557
T(Q)	-0,15371	0,10619	-1,44751	0,28471	-0,61061	0,30319	-0,07686	0,05309	-0,30530	0,15159
(3)E/S(L)	2,79116	0,09639	28,95736	0,00119	2,37644	3,20589	1,39558	0,04819	1,18822	1,60294
E/S(Q)	-0,56088	0,10619	-5,28184	0,03403	-1,01777	-0,10398	-0,28044	0,05309	-0,50889	-0,05199
1L by 2L	-0,11704	0,12588	-0,92973	0,45066	-0,65866	0,42459	-0,05852	0,06294	-0,32933	0,21230
1L by 3L	-0,33751	0,12588	-2,68112	0,11550	-0,87913	0,20412	-0,16875	0,06294	-0,43957	0,10206
2L by 3L	0,50675	0,12588	4,02559	0,05653	-0,03488	1,04838	0,25338	0,06294	-0,01744	0,52419

- Tabela ANOVA (ignorando efeitos não significativos)

ANOVA; Var.:VAR4; R-sqr=,94628; Adj.:,92186 (sav.sta)					
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Pure Error=,0316927					
DV: VAR4					
	SS	df	MS	F	p
(1)pH(L)	6,89034	1	6,89034	217,41	0,00457
pH(Q)	0,94241	1	0,94241	29,736	0,03202
T (L)	20,9196	1	20,9196	660,08	0,00151
(3)E/S(L)	26,5753	1	26,5753	838,53	0,00119
E/S (Q)	0,81815	1	0,81815	25,815	0,03662
Lack of Fit	3,15356	9	0,3504	11,056	0,08566
Pure Error	0,06339	2	0,03169		
Total SS	59,8799	16			

- Coeficientes de Regressão

Regr. Coefficients; Var.:VAR4; R-sqr=,94628; Adj.:,92186						
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Pure Error=,0316927						
DV: VAR4						
	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt
Mean/Interc.	9,24211	0,07705	119,955	7E-05	8,91061	9,57362
(1)pH(L)	0,71062	0,04819	14,7449	0,0046	0,50326	0,91798
pH(Q)	0,2767	0,05074	5,45307	0,032	0,05837	0,49503
T (L)	1,23821	0,04819	25,692	0,0015	1,03084	1,44557
(3)E/S(L)	1,39558	0,04819	28,9574	0,0012	1,18822	1,60294
E/S (Q)	-0,2578	0,05074	-5,08086	0,0366	-0,4761	-0,03949

