

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CRISTIANE BOURSCHEID

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE COPRODUTO DA
DESOSSA DE FRANGO E APLICAÇÃO DO HIDROLISADO EM HAMBÚRGUER

PONTA GROSSA

2015

CRISTIANE BOURSCHEID

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE COPRODUTO DA
DESOSSA DE FRANGO E APLICAÇÃO DO HIDROLISADO EM HAMBÚRGUER

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos pelo Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos da Universidade Estadual de Ponta
Grossa.

Orientadora: Dra. Ana Cláudia Barana

Co-orientador: Dr. Daniel Granato

PONTA GROSSA

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Bourscheid, Cristiane
B766 Otimização do processo de hidrólise
enzimática de coproduto da desossa de
frango e aplicação do hidrolisado em
hambúrguer/ Cristiane Bourscheid. Ponta
Grossa, 2015.
106f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e
Tecnologia de Alimentos - Área de
Concentração: Ciências e Tecnologia de
Alimentos), Universidade Estadual de Ponta
Grossa.
Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Cláudia
Barana.
Coorientador: Prof. Dr. Daniel Granato.

1.Otimização. 2.Protease. 3.Análise
sensorial. 4.Delineamento composto central
rotacional. I.Barana, Ana Cláudia. II.
Granato, Daniel. III. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
Ciência e Tecnologia de Alimentos. IV. T.

CDD: 664.02

TERMO DE APROVAÇÃO

CRISTIANE BOURSCHEID

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE COPRODUTO DA DESOSSA DE FRANGO E APLICAÇÃO DO HIDROLISADO EM HAMBÚRGUER

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:



Prof.ª. Dr.ª Ana Claudia Barana - UEPG



Prof.ª. Dr.ª. Sabrina Ávila Rodrigues - UTFPR



Prof.ª. Dr.ª. Deise Rosana Silva Simões – UEPG



Prof.ª. Dr.ª. Marina Tolentino Marinho - UEPG

Ponta Grossa, 11 de março de 2015.

Dedicatória

Dedico a dissertação aos meus pais e ao meu marido Cesar que sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre comigo e por me dar forças para cursar o Mestrado, também agradeço pela proteção concedida nas longas idas e vindas para Ponta Grossa.

Aos meus pais pelo apoio incondicional nos estudos durante toda a minha vida.

Ao meu querido e amado marido Cesar, por me apoiar em tudo, pelo companheirismo, carinho, amor e compreensão nas minhas ausências.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa pela excelente oportunidade concedida para cursar o Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Agradeço pelo acolhimento dos professores, colaboradores e colegas, bem como pela estrutura e pelo conhecimento técnico transmitido.

À Professora Dra. Ana Cláudia Barana pela orientação e por não medir esforços para ajudar em qualquer momento.

Ao Professor Dr. Daniel Granato pela co-orientação e por auxiliar nos questionamentos sobre análise estatística.

Às colegas Polyanna, Mayara, Andressa, Priscila, Ana Cláudia, pela amizade, apoio, caronas, refeições, pouso, risadas, trabalhos, artigos, apresentações, estudos, conversas... vocês, com toda certeza, foram muito importantes nessa caminhada!!!

Ao SENAI/SC (Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial) por disponibilizar os laboratórios didáticos para realização dos experimentos e por todo apoio concedido durante o curso.

Aos colegas do SENAI de São Miguel do Oeste e de Chapecó, Andréia Tirloni, Fabiane Schuster, Luciana Antunes, Ivanor Finato, Josiane Betat, Jaime França, Josiane Killian, Creciana Endres, Maristela Silveira, Fabiana Casarin, Andréia Faion, Elisa Sonza, Ivania Biazussi, que de uma forma ou de outra contribuíram muito para que o Mestrado e a dissertação fossem possíveis. A Brasil Foods pela doação da matéria-prima. A Novazymes pela doação da enzima. MUITO OBRIGADA!!!

Epígrafe

“Novas ideias não irão surgir se você não se der permissão.” Marc Benioff

“Um cientista determinado demais a confirmar sua hipótese corre o risco de ignorar descobertas que não estão de acordo com suas expectativas, dispensando-as como ruído ou erro em vez de tratá-las como novas descobertas e, assim, deixa passar dados que poderiam se tornar teorias mais frutíferas.” Daniel Goleman

RESUMO

Os frigoríficos de frango geram coprodutos durante o abate, por exemplo, penas, ossos, sangue e vísceras, geralmente, destinados para ração animal com baixo valor agregado. Uma parte de carne permanece aderida aos ossos, mesmo após a desossa, sendo uma boa fonte de substrato para a hidrólise enzimática. Os hidrolisados proteicos podem ser aplicados como suplemento nutricional em alimentos. Diante desse contexto, o objetivo do trabalho foi otimizar o processo de hidrólise enzimática para obtenção de hidrolisado proteico de coproduto da desossa de frango (*Gallus gallus domesticus*) e a adição do hidrolisado como suplemento proteico em hambúrguer. O coproduto selecionado para realização do trabalho foi osso de coxa e sobrecoxa proveniente da desossa de frango em frigorífico. O trabalho foi realizado em duas etapas. Na primeira um delineamento composto central rotacional (DCCR), totalizando 17 ensaios foi adotado para avaliar a influência da temperatura, relação enzima:substrato e tempo sobre o grau de hidrólise. Na sequência, foi realizada a otimização estatística para obter as melhores condições da hidrólise enzimática. O coproduto da desossa de frango e o hidrolisado proteico otimizado foram caracterizados em termos de composição centesimal, aminoácidos totais e perfil eletroforético. Na segunda etapa, o hidrolisado foi adicionado como suplemento proteico em hambúrguer de frango. Foram elaboradas duas formulações, hambúrguer controle (sem adição de hidrolisado proteico) e hambúrguer com hidrolisado (com adição de 8% de hidrolisado proteico). Os hambúrgueres foram caracterizados em termos de análises físico-químicas, análises microbiológicas e análise sensorial. As condições ótimas para a hidrólise enzimática foram temperatura (T) de 50°C, relação enzima:substrato (E:S) de 4,96% e tempo (t) de 110,16 minutos, nessas condições o grau de hidrólise foi de 24,21% $\pm$ 0,22. O hidrolisado proteico apresentou potencial para suplementação em alimentos, pois é boa fonte de aminoácidos essenciais, atendendo as recomendações estabelecidas pela FAO/WHO, exceto para leucina, fenilalanina e valina, bem como apresentou maior concentração de frações proteicas entre 14,437 kDa e 3,496 kDa. Os resultados obtidos para a análise microbiológica e análises físico-químicas do hambúrguer controle e do hambúrguer com hidrolisado, estão de acordo com os respectivos padrões estabelecidos pela legislação vigente. O hambúrguer com hidrolisado apresentou 6% mais proteína do que o hambúrguer controle, conferindo uma suplementação proteica ao produto desenvolvido. Em relação à análise sensorial para o atributo sabor, os avaliadores preferiram o hambúrguer com hidrolisado proteico. O hambúrguer com hidrolisado proteico e o hambúrguer controle obtiveram 84,2% e 81,8% de aceitação geral, respectivamente. A intenção de compra para o hambúrguer com adição de hidrolisado proteico foi de 76,4% e para o hambúrguer controle foi de 67%. Diante do exposto, o hidrolisado proteico obtido a partir de coproduto da desossa de frango é uma alternativa para a suplementação em alimentos, além de agregar valor ao coproduto da desossa de frango e aumentar a competitividade dos frigoríficos.

Palavras-chave: Otimização; Protease; Análise Sensorial; Delineamento Composto Central Rotacional.

ABSTRACT

The chicken slaughterhouse generate co-products during slaughter, for example, feathers, bones, blood and guts, usually intended for animal feed with low added value. In bone part of the meat remains bound even after deboning and is a good source of substrate for the enzymatic hydrolysis. The protein hydrolysates may be applied as a nutritional supplement in foods. Given this context, the objective was to optimize the enzymatic hydrolysis process for obtaining protein hydrolyzate co-product of chicken bones (*Gallus gallus domesticus*) and the addition of the hydrolyzate as a protein supplement in burger. The co-product selected to carry out the work was thigh and drumstick bone from the chicken bones in a slaughterhouse. The study was conducted in two stages. In the first one a central composite design (CCRD), a total of 17 tests was adopted to evaluate the influence of temperature, enzyme: substrate ratio and time on the degree of hydrolysis. Following the statistical optimization was performed to obtain the best conditions of enzymatic hydrolysis of co-product of chicken bones. The co-product of chicken bones and the optimized protein hydrolyzate were characterized in terms of chemical composition, total amino acids and pattern. In the second step, the hydrolyzate was added as a protein supplement in poultry burger, where two formulations were prepared, Hamburger control (no addition of protein hydrolyzate) and hamburger with hydrolyzed (with addition of 8% protein hydrolyzate). The burgers were characterized in terms of physical-chemical, microbiological and sensory analysis. The optimum conditions for the enzymatic hydrolysis were temperature (T) of 50 ° C, enzyme: substrate ratio (E: S) from 4.96% to time (t) of 110.16 minutes under these conditions the degree of hydrolysis was 24, 0.22 ± 21%. The protein hydrolyzate has the potential to supplementation in food, it is good source of essential amino acids, meeting the recommendations established by FAO / WHO, except for leucine, phenylalanine, and valine, and had a higher concentration of protein fractions from 14.437 kDa and 3,496 kDa. The results obtained for microbiological analysis and physical-chemical analysis of the burger control and burger with hydrolyzed, are in accordance with the respective standards set by law. The burger with hydrolyzate showed 1.02% more protein than the burger control, giving a protein supplementation to the product developed. In the sensorial analysis for flavor attribute evaluators preferred the burger with protein hydrolyzate. The burger with protein hydrolyzate and the burger control achieved 84.2% and 81.8% of general acceptance, respectively. The intention to buy for the burger with added protein hydrolyzate was 76.4% and for the burger control was 67%. In this light, the protein hydrolyzate obtained from chicken bones of the co-product is an alternative to supplementation in foods, as well as add value to the co-product of chicken dessosa and increase the competitiveness of slaughterhouse.

Keywords: Optimization; Protease; Sensorial Analysis; Central Composite Design.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.1: Destino da produção brasileira de carne de frango em 2013 (%)	18
Figura 1.2: Exportação mundial de carne de frango em 2013 (milhões de toneladas)	18
Figura 1.3: Estados exportadores de carne de frango em 2013 (% e milhões de toneladas)	19
Figura 1.4: Tipos de cortes de frango	20
Figura 1.5: Exportações brasileiras por produto de frango em 2013	21
Figura 1.6: Influência do pH em várias temperaturas na atividade da Protamex®	26
Figura 1.7: Sítio ativo da enzima	28

Capítulo 2

Figura 2.1: Coproduto da desossa de frango	44
Figura 2.2 Fluxograma para obtenção do hidrolisado proteico	45
Figura 2.3: Descongelamento da amostra	46
Figura 2.4: Etapas da hidrólise enzimática do coproduto de frango	49
Figura 2.5: Hidrolisado proteico antes e após a aplicação do TCA	50
Figura 2.6: Superfície de resposta e gráficos de contorno para o grau de hidrólise em função da concentração de enzima/substrato (E/S) e temperatura (T) (a) e do tempo (t) e da temperatura (T) (b).	58
Figura 2.7: Otimização do grau de hidrólise de coproduto da desossa de frango	60
Figura 2.8: Perfil eletroforético em gel do coproduto de frango e do hidrolisado proteico	66

Capítulo 3

Figura 3.1: Fluxograma de elaboração do hambúrguer de frango	76
Figura 3.2: Etapas da elaboração dos hambúrgueres de frango	77
Figura 3.3: Hambúrgueres de frango moldados	78
Figura 3.4: Frequência de respostas para aceitação geral para hambúrguer controle e com hidrolisado	83
Figura 3.5: Frequência de respostas para intenção de compra de hambúrguer controle e com hidrolisado	84

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.1: Composição centesimal da coxa e sobrecoxa de frango sem pele e cura (g/100g de carne)	21
Tabela 1.2: Perdas no processo de desossa de coxa e sobrecoxa de frango.	22
Tabela 1.3: Classificação dos aminoácidos	24
Tabela 1.4: Classificação das enzimas	25

Capítulo 2

Tabela 2.1: Valores utilizados no delineamento composto rotacional (DCCR) para as variáveis independentes	47
Tabela 2.2: Valores codificados e reais dos ensaios para a hidrólise enzimática.....	47
Tabela 2.3: Valores codificados e reais das variáveis independentes para os ensaios de hidrólise enzimática e grau de hidrólise como variável independente	54
Tabela 2.4: Efeitos da Temperatura (T), Concentração de (E/S) e Tempo (t) para o grau de hidrólise (GH) de coproduto de frango.	55
Tabela 2.5: Resultados teórico e experimental obtidos nas condições otimizadas para o grau de hidrólise	61
Tabela 2.6: Composição centesimal do coproduto de frango e do hidrolisado proteico	62
Tabela 2.7: Composição de aminoácidos totais (g/100g de proteína) do coproduto de frango e do hidrolisado proteico.....	64

Capítulo 3

Tabela 3.1: Formulações dos hambúrgueres de frango	75
Tabela 3.2: Resultados da composição centesimal para os hambúrgueres	80
Tabela 3.3: Resultados da análise microbiológica do hambúrguer controle e hambúrguer com hidrolisado proteico	81
Tabela 3.4: Médias de notas obtidas no teste de preferência para hambúrguer controle e com hidrolisado.....	81

LISTA DE EQUAÇÕES

Capítulo 1

Equação (1.1)	34
---------------------	----

Capítulo 2

Equação (2.1)	46
Equação (2.2)	51
Equação (2.3)	55
Equação (2.4)	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ACE-I - Enzima conversora de angiotensina
ANOVA – Análise de variância
AU - *Anson Units*
°C – Graus Celsius
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
CMS - Carne mecanicamente separada
DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional
DIPOA - Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal
Ea – Energia de ativação
E:S – Enzima: Substrato
FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
FCC - *Food Chemicals Codex*
GH – Grau de hidrólise
JECFA - *Expert Committee on Food Additives*
KDa – Kilodalton
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MSR – Metodologia de Superfície de Resposta
NEPA - Tabela brasileira de composição de alimentos
SDS-PAGE - Dodecil-sulfato de sódio (SDS) gel de poliacrilamida (PAGE)
SENAI - Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
TCA – Ácido tricloroacético
U - Unidade Internacional
UV/Vis – Ultravioleta/Visível
UBABEF - União Brasileira de Avicultura
WHO - *World Health Organization*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	15
OBJETIVOS	16
Objetivo geral	16
Objetivos específicos	16
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.1 CARNE DE FRANGO	18
1.2 PROTEÍNAS	23
1.2.1 Enzimas	24
1.2.1.1 Estrutura e classificação das enzimas	24
1.2.1.2 Protease	25
1.2.1.3 Fundamentos de enzimologia	27
1.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNA	28
1.4 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS E OTIMIZAÇÃO	32
1.5 HAMBÚRGUER	34
REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO 2: OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE COPRODUTO DA DESOSSA DE FRANGO	40
2.1 INTRODUÇÃO	43
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.2.1 Material	44
2.2.1.1 Matéria-prima	44
2.2.1.2 Enzima	44
2.2.2 Métodos	45
2.2.2.1 Obtenção do hidrolisado proteico	45
2.2.2.2 Planejamento experimental e otimização	46
2.2.2.3 Hidrólise enzimática	48

2.2.2.4 Grau de hidrólise	50
2.2.2.5 Análises físico-químicas.....	51
2.2.2.5.1 Composição centesimal.....	51
2.2.2.5.2 Aminoácidos totais.....	51
2.2.2.5.3 Perfil eletroforético	52
2.2.2.5.4 Análise estatística.....	53
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
2.3.1 Hidrólise enzimática	53
2.3.1.1 Planejamento experimental	53
2.3.1.2 Otimização.....	60
2.3.2 Análises físico-químicas	62
2.3.2.1 Composição centesimal	62
2.3.2.2 Aminoácidos totais	64
2.3.2.3 Perfil eletroforético	65
REFERÊNCIAS.....	68
CAPÍTULO 3: HAMBÚRGUER DE FRANGO COM ADIÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E SENSORIAL	71
3.1 INTRODUÇÃO	74
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	75
3.2.1 Material.....	75
3.2.2 Métodos	75
3.2.2.1 Formulação do hambúrguer	75
3.2.2.2 Fluxograma de elaboração do hambúrguer de frango.....	76
3.2.2.3 Análise microbiológica.....	78
3.2.2.4 Análises físico - químicas	78
3.2.2.5 Análise sensorial	79

3.2.2.6 Análise estatística	79
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
3.3.1 Análises físico – químicas	80
3.3.2 Análise microbiológica	80
3.3.3 Análise sensorial.....	81
3.4 CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS	86
CONCLUSÃO GERAL	88
ANEXOS	89

INTRODUÇÃO GERAL

Os aminoácidos essenciais são fundamentais para que as reações bioquímicas ocorram de maneira adequada no organismo dos seres humanos, porém, muitas pessoas no mundo não têm acesso a proteína. Ao mesmo tempo, a indústria de alimentos gera grande quantidade de coprodutos, muitas vezes com elevado teor de proteico. Entretanto, geralmente, esses coprodutos são destinados a ração animal apresentando um baixo valor agregado. A valorização dos coprodutos da agroindústria tem sido amplamente estudada e estão sendo elevados à condição de ingredientes devido ao elevado valor nutricional.

Os frigoríficos de frango geram coprodutos com alto teor proteico que podem ser utilizados como fonte de substrato para hidrólise enzimática, a partir da aplicação de enzimas que hidrolisam as proteínas conhecidas como proteases. O processo de hidrólise proteica consiste na clivagem enzimática de moléculas de proteínas em pequenos peptídeos de tamanhos diversos e em aminoácidos, visando a obtenção de hidrolisados.

Os hidrolisados proteicos obtidos por hidrólise enzimática tem vantagens como o aumento da solubilidade, melhoria das propriedades emulsificantes e liberação de peptídeos biologicamente ativos de certas proteínas. Neste contexto, eles podem ser utilizados como compostos de aromas, suplemento proteico, substrato para fermentação, antioxidantes e compostos bioativos (aminoácidos e peptídeos).

Esta dissertação está estruturada na forma de capítulos. O Capítulo 1 apresenta uma revisão bibliográfica sobre o assunto. O Capítulo 2 apresenta a otimização da hidrólise enzimática de coproduto da desossa de frango. O Capítulo 3 apresenta a elaboração de hambúrguer de frango com adição do hidrolisado proteico e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- ✓Otimizar o processo de hidrólise enzimática de coproduto da desossa de frango e avaliar a aplicação do hidrolisado em hambúrguer.

Objetivos específicos

- ✓Caracterizar a matéria-prima por meio de análise centesimal, composição de aminoácidos totais e perfil eletroforético;
- ✓Avaliar a influência da temperatura, relação enzima:substrato e tempo de hidrólise sobre o grau de hidrólise utilizando o delineamento composto central rotacional (DCCR) e análise por metodologia de superfície de resposta (MSR).
- ✓Otimizar o processo de hidrólise enzimática pelo uso da função desejabilidade.
- ✓Caracterizar o hidrolisado proteico obtido nas condições otimizadas por meio de análise centesimal, composição de aminoácidos totais e perfil eletroforético;
- ✓Suplementar o hambúrguer de frango com hidrolisado proteico otimizado e avaliar suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 CARNE DE FRANGO

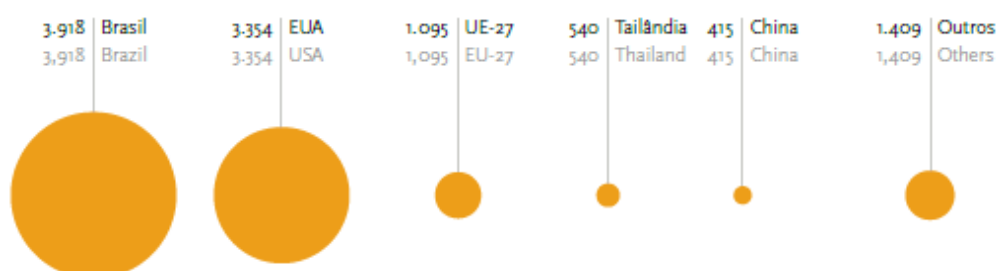
Em 2013 o Brasil produziu 12,399 milhões de toneladas de carne de frango, e o país é o maior exportador mundial de carne de frango. O consumo mundial *per capita* de carne de frango aumentou de 29,91 para 41,80 kg/hab entre 2000 a 2013. Do total de frango produzido no Brasil em 2013, 68,4% (8,481 milhões de toneladas) foram comercializados no mercado interno e 31,6% (3,918 milhões de toneladas) foram exportados (Figura 1.1) e (Figura 1.2) (UBABEF, 2014).

Figura 1.1: Destino da produção brasileira de carne de frango em 2013 (%)



Fonte: UBABEF. União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual, (2014).

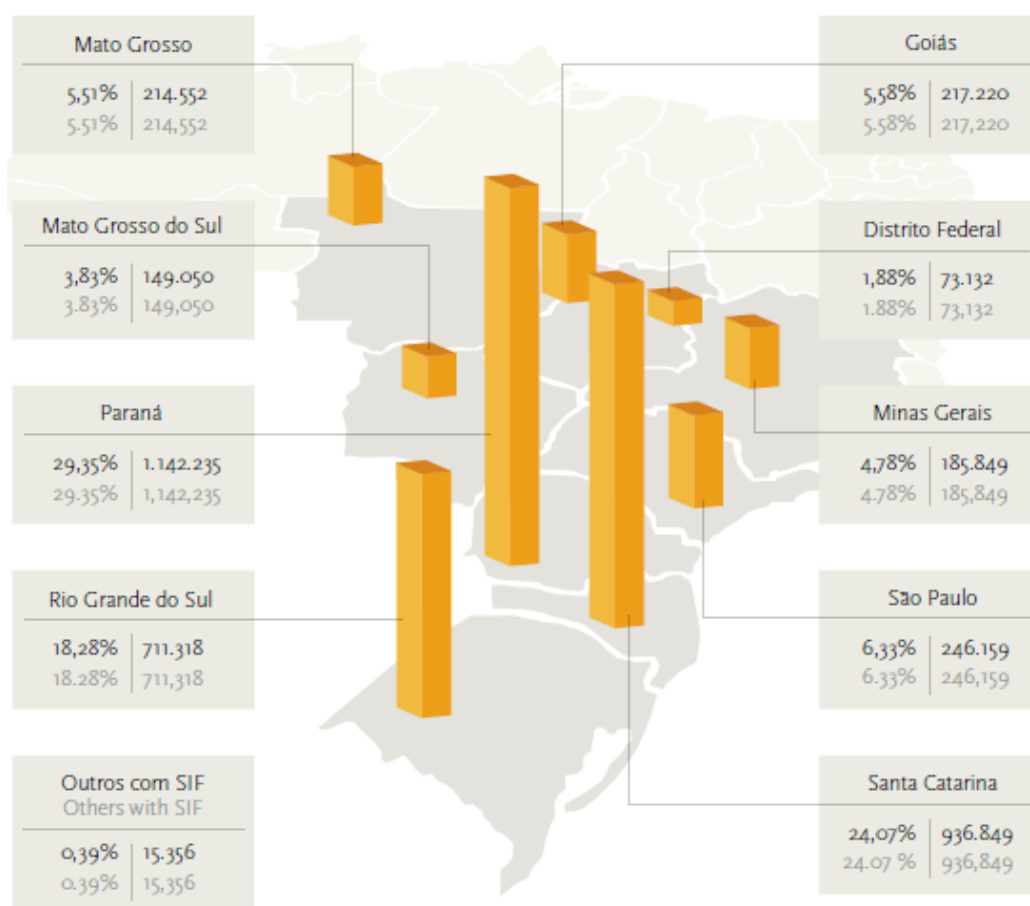
Figura 1.2: Exportação mundial de carne de frango em 2013 (milhões de toneladas)



Fonte: UBABEF. União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual, (2014).

A região sul do Brasil é a maior exportadora de carne de frango, responsável por 71,7% das exportações do país em 2013. Os estados do Paraná, Santa Catarina e o Rio Grande do Sul responderam por 29,35%, 24,07% e 18,28% das exportações nesse período, respectivamente (Figura 1.3). (UBABEF, 2014).

Figura 1.3: Estados exportadores de carne de frango em 2013 (% e milhões de toneladas)



Fonte: UBABEF. União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual, (2014).

As indústrias passaram a estruturar-se para o mercado externo, bem como a Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou normas para padronizar as atividades de corte nos abatedouros (OLIVO; RABELO, 2006). Segundo a Portaria nº 210 do Ministério da Agricultura, entende-se por corte (Figura 1.4), a parte ou fração da carcaça, com limites previamente especificados pelo DIPOA, com osso ou

sem osso, com pele ou sem pele, temperados ou não, sem mutilações e/ou dilacerações (BRASIL, 1998).

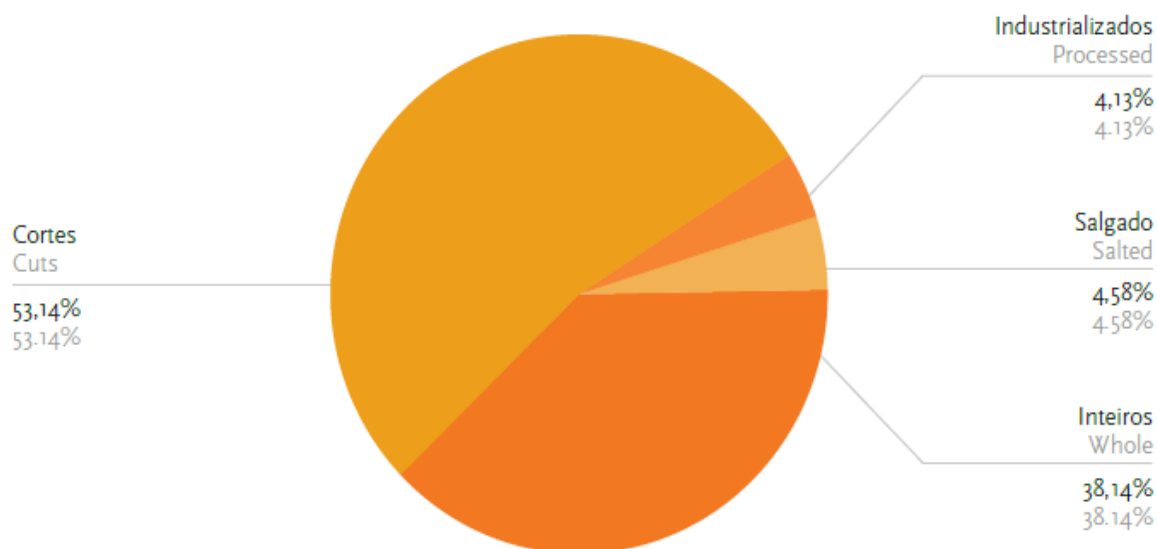
Figura 1.4: Tipos de cortes de frango



Fonte: UBABEF. União Brasileira de Avicultura. Tipos de cortes de frango (2013).

Os cortes de frango e os produtos industrializados responderam por 53,14% e 4,13% das exportações de frango em 2013, respectivamente, (Figura 1.5).

Figura 1.5: Exportações brasileiras por produto de frango em 2013



Fonte: UBABEF. União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual, (2014).

De acordo com Olivo e Rabelo (2006), no Brasil as coxas com sobrecoxas são comercializadas *in natura* juntas ou em cortes de coxas e sobrecoxas separadas. Para o mercado externo, as coxas e sobrecoxas são comercializadas em maior quantidade para o mercado asiático que consome grande variedade de cortes, o que contribui para a manutenção das vendas com maior valor agregado, visto que requer mão de obra especializada. Na (Tabela 1.1) pode ser visualizada a composição centesimal da coxa e sobrecoxa de frango, que possuem 17,8% e 17,6% de proteína, respectivamente.

Tabela 1.1: Composição centesimal da coxa e sobrecoxa de frango sem pele (g/100g de carne)

Componente	Coxa	Sobrecoxa
Umidade	76,4	72,7
Proteína	17,8	17,6
Lipídeos	4,9	9,6
Colesterol	91 mg	84 mg
Carboidrato	0,0	0,0
Fibra alimentar	NA	NA
Cinzas	0,9	0,9

Fonte: TABELA brasileira de composição de alimentos. NEPA – UNICAMP, (2011).

As indústrias do segmento avicultor brasileiro intensificam a implementação de soluções tecnológicas na busca por competitividade. Diante da escassez de mão de obra qualificada, a automatização de linhas de produção tem sido fator determinante para as empresas de o setor garantirem resultados eficientes e aumentarem o valor agregado para estar à frente da concorrência. Um dos produtos a receber estes investimentos é o *kakugiri*, cubos de coxa ou sobrecoxa de frango desossados, item bastante consumido pelo Japão, que encontra o Brasil como o seu principal exportador (AUTOMAÇÃO, 2013).

No trabalho realizado por Takeda *et al.* (2008), as perdas da desossa de coxa e sobrecoxa de frango foram calculadas por meio de raspagem dos ossos após serem desossados pelos colaboradores que fazem parte do processo. A coleta e raspagem foram realizadas em 4 amostragens diárias de 10 ossos por amostra, todos os dias da semana, durante o período de um mês, totalizando 240 amostras por semana. Observando os resultados foi possível verificar que o valor da perda foi da meta que é 3,37g de carne/osso definida pela frigorífico avaliado (Tabela 1.2).

Tabela 1.2: Perdas no processo de desossa de coxa e sobrecoxa de frango.

Item	Quantidade média (g carne/osso)	Meta (g carne/osso)
1º semana	5,20	3,37
2º semana	5,00	3,37
3º semana	4,71	3,37
4º semana	4,74	3,37

Fonte: Takeda *et al.* (2008).

Observa-se que, mesmo atingindo a meta de 3,37g de carne/osso, ocorre a geração de coproduto. Considerando um frigorífico que abate 200.000 frangos por dia a quantidade de carne residual no osso é de 1.348 kg/dia. Os ossos da coxa e sobrecoxa com carne residual são, geralmente, direcionados para produção de ração animal. Segundo Fu-Yuan *et al.* (2008) esses coprodutos contêm quantidades elevadas de proteína na forma de carne, cartilagem e medula óssea, o que representa uma boa fonte de proteína para a hidrólise enzimática.

As plantas de processamento de frango de todo o mundo geram grande quantidade de coprodutos sólidos na forma de cabeças, ossos, vísceras e penas. Esses resíduos são muitas vezes transformados em ração animal, fertilizantes ou totalmente eliminados. O descarte inadequado desses resíduos provoca poluição ambiental, doenças e perda de recursos biológicos úteis, como proteínas, enzimas e lipídios. A utilização de métodos que fazem uso desses componentes biológicos para a produção de produtos de valor agregado ao invés do uso direto do coproduto, pode ser uma opção viável. Portanto, existem várias pesquisas sobre esses coprodutos como fontes de hidrolisados de proteínas, enzimas e ácidos graxos poli-insaturados. Devido às múltiplas aplicações de hidrolisados proteicos em vários ramos da ciência e da indústria a literatura vem relatando a conversão de coprodutos animais para hidrolisados (LASEKAN; BAKAR; HASHIM, 2013).

1.2 PROTEÍNAS

As proteínas são estruturas formadas por aminoácidos. No átomo de carbono α , os 20 aminoácidos que formam as proteínas têm em comum um grupamento carboxílico livre e um amino grupo livre, exceto a prolina. A diferenciação dos aminoácidos é devido à estrutura das cadeias laterais, conhecidas como grupamento R. (LEHNINGER, 1976).

Portanto, é a natureza dessas cadeias laterais que determinará o papel de um aminoácido em uma proteína. Dessa forma, os aminoácidos são classificados de acordo com as propriedades de suas cadeias laterais: apolares e polares (ácidos e bases). Os aminoácidos são ligados covalentemente por ligações peptídicas, as quais são ligações amidas entre o grupo α -carboxila de um aminoácido e o grupo α -amino de outro. As ligações peptídicas não são rompidas por condições desnaturantes, como aquecimento ou altas concentrações de uréia. Deve haver uma exposição prolongada a um ácido ou uma base forte em temperaturas elevadas para hidrolisar essas ligações de forma não-enzimática. (CHAMPE et al., 2006).

O que caracteriza cada proteína é o número de aminoácidos componentes de sua cadeia e a ordem que elas se encontram, ou seja, a sua estrutura primária. Assim, apesar de serem constituídas por apenas 20 aminoácidos diferentes, as possibilidades de estruturas para as proteínas são diversas (TORRES, 2001).

Os aminoácidos são classificados em aminoácidos essenciais e não-essenciais. Os aminoácidos essenciais não podem ser produzidos pelo organismo humano, sendo somente adquiridos pela ingestão de alimentos, vegetais ou animais. Já os aminoácidos não-essenciais são sintetizados pelo organismo humano conforme a Tabela 1.3. CHAMPE *et al.*, 2006.

Tabela 1.3: Classificação dos aminoácidos

Aminoácidos Essenciais	Aminoácidos não-essenciais
Fenilalanina	Alanina
Isoleucina	Asparagina
Leucina	Cisteína
Lisina	Glicina
Metionina	Glutamina
Treonina	Prolina
Triptofano	Tirosina
Histidina	Ácido aspártico
Valina	Ácido glutâmico
	Arginina
	Serina

Fonte: SGARBIERI, 1996.

1.2.1 Enzimas

1.2.1.1 Estrutura e classificação das enzimas

As enzimas são proteínas globulares e, como todas as proteínas, são heteropolímeros de 20 diferentes aminoácidos. Algumas incluem em sua estrutura um componente não protéico, designado grupo prostético. São macromoléculas, com peso molecular variando de 5.000 até mais de 1.000.000 de daltons. (TORRES, 2001). Todas as enzimas são proteínas, entretanto, algumas moléculas de RNA (ácido ribonucléico) também apresentam atividade catalítica (LEHNINGER, 1976).

A atividade catalítica de uma enzima está diretamente relacionada à estrutura da proteína nativa. Para que a enzima obtenha uma excelente atividade catalítica, ela não pode estar desnaturada. Quando uma enzima sofre desnaturação, sua atividade catalítica é destruída, pois suas estruturas protéicas são essenciais para essa atividade catalítica. A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) desenvolveu um sistema de nomenclatura no qual as enzimas são divididas em seis classes principais (Tabela 1.4), (CHAMPE et al., 2006).

Tabela 1.4: Classificação das enzimas

Classe	Tipo de reação
Oxidoredutases	Oxidorredução
Transferases	Transferências de grupos
Hidrolases	Hidrólise
Liasas	Adição de grupos a duplas ligações ou remoção dos grupos, deixando dupla ligação
Isomerases	Rearranjos intramoleculares
Ligases	Condensação de duas moléculas, associada a hidrólise de uma ligação de alta energia (em geral ATP)

Fonte: Adaptado de (TORRES, 2001).

1.2.1.2 Proteases

As proteases são enzimas que pertencem ao grupo das hidrolases, catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas. Todas as proteases apresentam um grau de especificidade de substrato, em geral relacionado aos aminoácidos envolvidos na ligação peptídica a ser hidrolisada e àqueles adjacentes a eles. A posição da ligação na cadeia polipeptídica e o tamanho da cadeia podem influenciar a atividade das proteases, (KOBBLITZ, 2013).

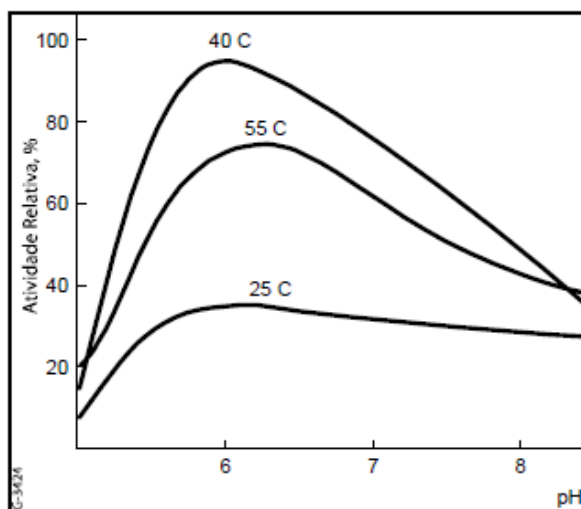
A protease Protamex®, da Novozymes, é um complexo de proteases obtida por duas espécies de *Bacillus*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens*,

que é produzida por fermentação submersa e desenvolvida para a hidrólise de proteínas alimentares. A proteína enzimática é separada e purificada do organismo produtor. Nesse produto a atividade enzimática é fornecida por serina endoprotease, que hidrolisa ligações peptídicas internas. O produto está de acordo com as especificações de pureza recomendadas para as enzimas de grau alimentício definidas pelo *Joint FAO/WHO – Expert Committee on Food Additives* (JECFA) e o *Food Chemicals Codex* (FCC) (NOVOZYMES, 2013).

A Protamex® é padronizada em Anson Units/g (AU/g), possui atividade declarada de 1,5 AU/g, baseada na proteólise da hemoglobina desnaturada. Em contraste com várias outras endoproteases, de acordo com o fabricante a Protamex® irá produzir hidrolisados protéicos não amargos, mesmo a baixos graus de hidrólise. As condições ótimas de trabalho são pH 5.5-7.5 e 35-60°C conforme determinado pelos testes de aplicação (NOVOZYMES, 2013).

Na Figura 1.6 as atividades demonstradas são medidas de acordo com o Método de Anson modificado e o substrato utilizado foi hemoglobina desnaturada. A estabilidade da Protamex® a uma determinada temperatura é influenciada pelo tipo e concentração das proteínas presentes. Pode ser inativada em 30 minutos a 50°C ou acima quando o pH é 4, e em 10 minutos a 85°C ou acima quando o pH é 8.

Figura 1.6: Influência do pH em várias temperaturas na atividade da Protamex®



Fonte: (NOVOZYMES, 2013).

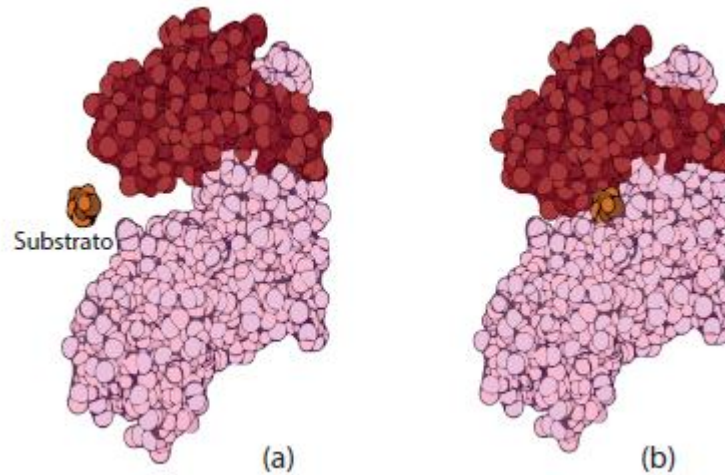
1.2.1.3 Fundamentos de enzimologia

A teoria das colisões estabelece que as moléculas devem colidir com orientação adequada para que elas adquiram uma quantidade mínima de energia para atingir o estado de transição. A energia de ativação é a quantidade de energia necessária para transferir um mol de uma substância até o estado de transição. A velocidade de uma reação será diretamente proporcional ao número de moléculas com energia igual ou maior do que a do estado de transição. Os catalisadores auxiliam as reações químicas reduzindo o valor de energia de ativação, similar ao que ocorre no nosso organismo, (MARZZOCO; TORRES, 1999).

Segundo Champe *et al.* (2006), as enzimas mostram diferentes respostas às alterações de concentração de substrato, temperatura e pH. Em relação a concentração a reação catalisada por uma enzima aumenta conforme a concentração do substrato, até a velocidade máxima ser atingida. A velocidade de reação aumenta com a temperatura, até atingir um pico de velocidade. Uma elevação maior da temperatura, acima da considerada ótima, resulta em uma redução na velocidade da reação, como consequência da desnaturação da enzima, induzida pela temperatura. Dependendo do pH, pode ocorrer variação na velocidade da reação enzima.

Durante a catálise, o substrato é ligado a uma pequena região da enzima chamado de sítio ativo, (Figura 1.7). O sítio ativo é uma cavidade com formato definido, permitindo, assim, que a enzima possa reconhecer seu substrato e, para ser aceita, a molécula deve ter o formato adequado para “encaixar-se” no sítio ativo. Portanto, existem especificidades entre a enzima e o substrato. A análise da estrutura da enzima na ausência e presença do substrato, realizada por difração de raios X e outros métodos, mostra com clareza que a aproximação e a ligação do substrato induzem, na enzima, uma mudança na sua forma, tornando-a ideal para a catálise, (MARZZOCO; TORRES, 1999).

Figura 1.7: Sítio ativo da enzima



Fonte: Adaptado de (MARZZOCO; TORRES, 1999).

A dosagem de enzimas é realizada por meio da medida da sua atividade, que é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa. Para medir a atividade das enzimas, uma amostra da solução com enzima é incubada com concentrações altas de substratos e a velocidade da reação é medida e expressa em Unidades Internacionais. Uma Unidade Internacional (U) é a quantidade de enzima capaz de formar $1\mu\text{mol}$ de produto por minuto em condições ótimas de medida (pH, temperatura, etc.), especificadas para cada caso (TORRES, 2001).

1.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNA

O processo de hidrólise protéica consiste na clivagem química ou enzimática de moléculas de proteínas em pequenos peptídeos de tamanhos diversos e, eventualmente, em aminoácidos (ADLER-NISSEN, 1986). A hidrólise química é realizada pela quebra de ligações peptídicas com ácidos ou bases. Entretanto, esse método apresenta algumas limitações, como destruição de alguns aminoácidos,

comprometendo o valor nutricional da proteína, e dificuldade de controle de processo, gerando quase sempre produtos com composição química e propriedades funcionais variáveis (SGARBIERI, 1996).

Na hidrólise enzimática, enzimas proteolíticas são empregadas para hidrolisar a proteína do alimento, resultando na formação de duas fases: uma insolúvel, geralmente utilizada em ração animal; e outra solúvel, rica em proteína hidrolisada e que pode ser convertida em ingrediente a ser incorporado em alimentos processados (KUROZAWA; PARK; HUBINGER, 2009). A hidrólise enzimática possui algumas vantagens sob outros métodos de hidrólise como o aumento da solubilidade, das propriedades emulsificantes dos hidrolisados e também o aumento da liberação de peptídeos biologicamente ativos de certas proteínas (SPELLMAN et. al., 2003).

Os parâmetros mais críticos para monitorar a hidrólise enzimática são a temperatura, o tempo de hidrólise e o pH. As condições de hidrólise são controladas para atender as características específicas de produtos, tais como a distribuição de aminoácidos, a distribuição de peso molecular, e quantidade de proteína intacta residual. A escolha de uma enzima também é determinada por uma combinação de eficácia e de economia (LAHL; BRAUN, 1994).

A hidrólise enzimática protéica tem sido aplicada em diferentes substratos e com diversos tipos de proteases. Contudo, muitos estudos foram realizados com subprodutos de pescados. O hidrolisado gerado pode ser utilizado como compostos de aromas, suplemento proteico em alimentos, substrato para fermentação, antioxidantes, compostos bioativos (aminoácidos e peptídeos), conforme pode ser observado nas pesquisas no Quadro 1.1.

A aplicação dos hidrolisados varia em função da distribuição do peso molecular dos peptídios. Assim, peptídios com pesos moleculares entre 5 e 20 kDa são utilizados, geralmente, como fontes de nitrogênio, em alimentos para fins especiais e suplementos alimentares para adultos. Já, peptídios com pesos moleculares menores que 5 kDa são oriundos de proteínas altamente hidrolisadas

sendo frequentemente utilizados em formulações hipoalergênicas (MAHMOUD,1994).

Os hidrolisados protéicos são utilizados como ingredientes em vários alimentos, com o objetivo de conferir sabor característico, alterar a textura, emulsificar, produzir espuma ou aumentar o valor nutricional. Hidrolisados de carne bovina e peixe são usados como flavorizantes na produção de temperos, caldos, sopas e molhos (KOBLITZ, 2013).

Os peptídeos bioativos são peptídeos curtos de aproximadamente 2-30 aminoácidos de comprimento. Eles estão inativos na sequência da proteína original e podem ser liberados durante a digestão gastrointestinal, durante o processamento de alimentos ou por hidrólise utilizando enzimas comerciais. Os derivados cárneos tem uma infinidade de peptídeos bioativos potenciais para aplicação como antioxidantes, antimicrobianos, antitrombóticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina I (ACE-I). Antioxidantes e antimicrobianos de peptídeos isolados a partir de fontes de músculo de carne podem ser utilizados como ingredientes potencialmente funcionais em alimentos (DI BERNARDINI et al., 2011).

A desvantagem da hidrólise proteica é o desenvolvimento do gosto amargo, resultado da formação de peptídeos que contêm um ou mais aminoácidos C-terminais hidrofóbicos (KOBLITZ, 2013). Em sua forma intacta, ou seja, na forma de proteína globular, as cadeias hidrofóbicas encontram-se escondidas no interior da molécula, não interagindo com células receptoras do gosto amargo. Quando a proteína é degradada pela ação da protease, os peptídeos contendo os aminoácidos hidrofóbicos ficam expostos e, assim, são capazes de interagir com os receptores, resultando na detecção do gosto amargo (ADLER-NISSEN, 1986).

O controle das condições de hidrólise enzimática e a escolha adequada da enzima permitem a obtenção de produtos com características adequadas, a uma dada aplicação na formulação de alimentos. Este processo possui influência no tamanho molecular, hidrofobicidade e nos grupos polares do hidrolisado. Assim, os hidrolisados protéicos podem ser utilizados para suplementar e obter novos produtos

alimentícios, alterar as propriedades funcionais das proteínas e como componente de sabor (KUROZAWA; PARK; HUBINGER, 2009).

Quadro 1.1 :Estudos realizados sobre hidrólise enzimática proteica

Produto ou subproduto	Enzima (protease)	Aplicação	Autores	Ano
Subproduto de lagosta	Optimase	Compostos aromáticos de aromas concentrados.	Baek; Cadwallader.	1996
Músculo dogfish (<i>Squalus acanthias</i>)	Alcalase	Suplemento proteico em alimentos.	Diniz; Martins.	1997
Camarão	Quimotripsina e tripsina	Aminoácidos Suplemento para alimentos.	Simpson <i>et al.</i>	1998
Subproduto (estômago) de atum	Umamizyme	Peptídeos e nitrogênio (substrato para fermentação).	Guerard; Guimas; Binet.	2002
Subproduto de salmão <i>Salmo salar</i> , L.	Protamex™	Aminoácidos.	Liaset et al.	2002
Vísceras de sardinha	Alcalase Protamex Flavourzyme and	Fosfolipídios	Dumay <i>et al.</i>	2006
Vísceras de ovelha (estômago, intestino grosso e delgado)	P Amano 6 Fungal protease	Aminoácidos essenciais.	Bhaskar <i>et al.</i>	2007
Carpa	Alcalase e Flavourzyme	Antioxidantes e compostos bioativos.	Shiyuan <i>et al.</i>	2008
Ossos da coxa desossada.	Alcalase, pepsina e tripsina	Peptídeo inibidor de enzima conversora de angiotensina I. Anti-hipertensivo.	Fu-Yuan <i>et al.</i>	2008; 2009
Peito de frango	Alcalase	Aminoácidos essenciais. Suplemento para alimentos.	Kurozawa; Park; Hubinger.	2008; 2009
Mexilhão	Protamex	Aromatizante. Suplemento em alimentos.	Silva; Park; Hubinger.	2010
Subproduto (vísceras) de atum	Alcalase	Aminoácidos	Ovissipour <i>et al.</i>	2012
<i>Collichthys niveatus</i>	Alcalase, Neutrase, Protamex, e Flavourzyme	Aminoácidos	Qing <i>et al.</i>	2012
Anchova	Alcalase, Flavourzyme, Protamex, papaína, bromelina, Promod.	Antioxidante.	Ovissipour <i>et al.</i>	2013

Liaset *et al.* (2002) estudaram a recuperação de nitrogênio na hidrólise enzimática dos subprodutos de salmão (*Salmo salar*, L.) com a protease Protamex®. De acordo com os autores esta protease foi selecionada para o estudo por produzir um hidrolisado sem gosto amargo. Após 60 minutos de hidrólise a maior parte do nitrogênio solúvel foi solubilizado. As condições ótimas de temperatura e pH obtidas foram de 50-56°C e 6,5-7,7, respectivamente. Porém, os autores não realizaram análise sensorial no hidrolisado para avaliar a presença ou ausência de gosto amargo.

O trabalho desenvolvido por Silva; Park e Hubinger (2010) teve como objetivo a otimização da hidrólise enzimática da carne de mexilhão usando a enzima Protamex®, com a metodologia de superfície de resposta (MSR). Os resultados mostraram que a condição ótima de reação de hidrólise foi a pH de 6,85, temperatura 51°C e relação enzima:substrato de 4,5%, com 26,5% de grau de hidrólise e 65% de recuperação de proteína. A composição de aminoácidos revelou que o ácido glutâmico, o ácido aspártico e triptofano foram seus principais componentes, no entanto histidina e leucina foram aminoácidos limitantes. O hidrolisado de mexilhão pode ser usado como um agente aromatizante, além de apresentar um bom valor nutricional.

1.4 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS E OTIMIZAÇÃO

Em qualquer área de pesquisa é de interesse saber quais as variáveis importantes no estudo que será realizado, assim como, limites inferior e superior de valores dessas variáveis. A partir dos resultados dos estudos, técnicas estatísticas devem ser utilizadas de modo a se concluir algo em relação as variáveis analisadas. O planejamento experimental é uma dessas técnicas, que atualmente vem sendo usada em grande escala. Por meio dele, pesquisadores podem determinar as variáveis que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, tendo como resultado: redução da variação do processo, redução do

tempo do processo, redução do custo operacional e melhoria no rendimento do processo (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

A escolha do planejamento adequado é uma função direta do número de variáveis independentes envolvidas no estudo, da disponibilidade de matéria-prima, da viabilidade do número de ensaios que podem ser realizados e do custo do processo em estudo. No entanto, há um número mínimo de ensaios que devem ser realizados conforme o número de fatores que se deseja estudar, para que a discussão dos resultados e a interpretação estatística não fiquem comprometidas. No caso de 2 a 3 variáveis independentes ou fatores, recomenda-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) (RODRIGUES; LEMMA, 2009).

Quando se tem mais de uma variável de resposta, geralmente, tem-se interesse em encontrar valores operacionais ótimos das variáveis independentes que satisfaçam simultaneamente todos os requisitos necessários às variáveis dependentes. Inicialmente é necessário determinar o modelo apropriado para descrever as variáveis de resposta e então encontrar uma série de condições operacionais que otimize todas as respostas ou, no mínimo, as mantenha em faixas desejáveis. A busca dessa faixa desejável pode ser realizada graficamente, por meio de sobreposições das curvas de nível para todas as respostas. Pelo fato dessas curvas serem bidimensionais, esse método se torna confuso para mais de dois fatores. O melhor é usar o procedimento de otimização com restrição também conhecido como programação não linear (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

O *Statistic software* comercial de análise estatística usa a abordagem utilizada por Derringer e Suich (1980), que propuseram o uso da função de desejabilidade. A abordagem geral consiste em converter primeiro cada resposta Y_i em uma função individual *desirability* d_i , que varia em uma faixa de $0 \leq d_i \leq 1$. Se a resposta for aquela que se quer, $d_i = 1$ e se a resposta estiver fora da região aceitável, $d_i = 0$. Assim, as variáveis independentes são escolhidas de modo a maximizar a *desirability* global, (Equação 1.1), (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_m)^{1/m}$$

Equação (1.1)

1.5 HAMBÚRGUER

Segundo Terra (1998) a industrialização das carnes tem por objetivo o aumento a vida útil, desenvolvimento de diferentes sabores e utilização de partes do animal de difícil comercialização quando no estado fresco. A carne, devido, ao seu elevado valor nutricional e sua grande quantidade de água disponível, torna-se um alvo fácil aos micro-organismos deterioradores, bem como aos micro-organismos patogênicos, sendo capazes de ocasionar danos à saúde do consumidor. O emprego de aditivos, do calor e do frio, bem como do uso das boas práticas de fabricação possibilitam a obtenção de produtos cárneos saudáveis e seguros.

Entende-se por hambúrguer o produto cárneo industrializado obtido da carne moída dos animais de açougue, adicionado ou não de tecido adiposo e ingredientes, moldado e submetido a processo tecnológico adequado. O mesmo deve apresentar proteína mínima de 15%, gordura máxima de 23% e carboidratos totais de 3%. Podendo ser adicionados ingredientes opcionais tais como: gordura animal, gordura vegetal, água, sal, proteínas de origem animal e/ou vegetal, leite em pó, açúcares, maltodextrina, aditivos intencionais, condimentos, aromas, especiarias, vegetais, queijos e outros recheios (BRASIL, 2000).

A indústria e o comércio têm apresentado alternativas alimentares adaptadas às condições urbanas e novas modalidades na forma de se alimentar que contribui para mudanças de hábito do consumidor (MARQUES, 2007). Nessas mudanças de hábito alimentar, inclui-se os alimentos tipo *fast-food*, que podem ser encontrados em lanchonetes que vão desde as pequenas até as grandes redes multinacionais. O hambúrguer, faz parte do hábito alimentar da população brasileira, por suas características sensoriais e por ser um produto de fácil preparo, ainda apresenta elevado teor de lipídios, proteína de alto valor biológico, vitaminas e minerais em sua

composição. No Brasil, o consumo de lanches, em especial o hambúrguer, tem aumentado bastante entre consumidores de todas as faixas etárias, sendo preferido entre as crianças e adolescentes e muito apreciado por adultos (OLIVO, 2004).

O hambúrguer é uma alternativa para o aproveitamento de carnes menos nobres, e sua produção possibilita aumentar o lucro dos abatedouros. Assim, para profissionais da área de alimentos, é um assunto de interesse que fornece subsídios para o desenvolvimento de novos produtos e conhecimento de inovações tecnológicas (COSTA, 2004).

REFERÊNCIAS

- ADLER-NISSEN J. 1986. **Enzymatic hydrolysis of food protein**. London: Elsevier Applied Science Publishers. 427 p.
- AUTOMAÇÃO com foco no mercado japonês. Disponível em: <http://www.marel.com/>. Acesso em: 01 jul. 2013.
- BAEK, H. H.; CADWALLADER, H. H. Volatile Compounds in Flavor Concentrates Produced from Crayfish-Processing Byproducts with and without Protease Treatment. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 44, p. 3362-3267, 1996.
- BHASKAR, N.; MODI, V. K.; GOVINDARAJU, K.; RADHA, C.; LALITHA, R. G. Utilization of meat industry by products: Protein hydrolysate from sheep visceral mass. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 388–394, 2007. Doi:10.1016/j.biortech.2005.12.017.
- BRASIL, Portaria nº 210 de 10 de novembro de 1998. **Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carnes de Aves**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, p. 226 de nov. 1998.
- BRASIL, Instrução Normativa nº 20, de 31 de Julho de 2000. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Almôndega, de Apresuntado, de Fiambre, de Hamburguer, de Kibe, de Presunto Cozido e de Presunto**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, v. 1, n. 1 – 2, p. 3, 31 de jul. 2000.
- CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos usando *Statística***. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, p. 260, 2003.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 544 p.
- COSTA, L. O. **Processamento e diminuição do reprocesso do hambúrguer bovino (HBV)**. TCC (Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Alimentos) – Universidade Católica de Goiás. Goiânia, n. 3, p. 127, 2004.
- DERRINGER, G.; SUICH, R. (1980), Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology** 12, 214-219.
- DI BERNARDINI, R.; HARNEDY, P.; BOLTON, D.; KERRY, J.; O'NEILL, E.; MULLEN, A. M.; HAYES, M. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1296–1307, 2011. Doi:10.1016/j.foodchem.2010.07.004.

DINIZ, F. M.; MARTIN, A. M. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein. Composition of the hydrolysates. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 48, p. 191-200, 1997.

DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; BERGE, J. P. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2327–2332, 2006.

FU-YUAN, C.; YU-TSE, L.; TIEN-CHUN, W.; LIANG-CHUAN, L.; RYOICHI, S. The development of angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from chicken bone protein. **Animal Science Journal**, v. 79, p. 122–128, 2008. Doi: 10.1111/j.1740-0929.2007.00507.x.

FU-YUAN, C.; YU-TSE, L.; TIEN-CHUN, W.; LIANG-CHUAN, L.; RYOICHI, S. Determination of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in chicken leg bone protein hydrolysate with alcalase. **Animal Science Journal**, v. 80, p. 91–97, 2009. Doi: 10.1111/j.1740-0929.2008.00601.x

GUERARD, F.; GUIMAS, L.; BINET, A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19–20, dez. 2002, p. 489–498. Doi: 10.1016/S1381-1177(02)00203-5.

KOBLITZ, MARIA GABRIELA BELLO. **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2013. 242 p.

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Optimization of the Enzymatic Hydrolysis of Chicken Meat Using Response Surface Methodology. **Food Chemistry**, v. 73, n. 5, 2008. Doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00765.x.

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. 2009, 188 f. **Estudos dos processos de hidrólise enzimática e secagem por atomização para obtenção de hidrolisado proteico de frango em pó**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of proteins hydrolysates for food use. **Food Technology**, v. 48, p. 68–71, 1994.

LASEKAN, A.; BAKAR, F. A.; HASHIM, D. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. **Waste Management**, v. 33, p. 552–565, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2012.08.001>.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica: componentes moleculares das células**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1976. 262 p.

LIASET, B.; NORTVEDT, R.; LIED, E.; ESPE, M. Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex™ protease. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1263–1269, 2002.

MARQUES, J de M. **Elaboração de um produto de carne bovina “Tipo Hambúrguer” adicionado de farinha de aveia**. 2007. p. 71. Mestrado (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Setor de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MARZZOCO, Anita; TORRES, Bayardo Baptista. **Bioquímica básica**. 2. ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 1999. 360 p.

MAHMOUD, M.I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technol.**, v.48, n.10, p.89-95, 1994.

Novozymes. **Ficha técnica Protamex®**. Bagsvaerd Denmark, 2013.

OLIVO, R. **Carne bovina e saúde humana**. Revista Nacional da Carne. ed. 332. Outubro, 2004, p. 332.

OLIVO, N.; RABELO, R. A. Cortes e rendimentos. In: OLIVO, R. (Org.). **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango**. Criciúma: Rubison Olivo, 2006. p. 281-286.

OVISSIPOUR, M.; KENARI, A. A.; MOTAMEDZADEGAN, A; NAZARI, R. M. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*). **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 696-705, mai. 2012. Doi: 10.1007/s11947-010-0357-x.

OVISSIPOUR, M.; RASCO, B.; SHIROODI, S. G., MODANLOW, M., GHOLAMID, S., NEMATI, M. Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. **Journal Science Food Agriculture**, v. 93, p. 1718–1726, 2013.

QING, S.; RUI, G.; ZHIYUAN, D.; YANPING, Z. Investigation of Enzymatic Hydrolysis Conditions on the Properties of Protein Hydrolysate from Fish Muscle (*Collichthys niveatus*) and Evaluation of Its Functional Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5192–5198, 2012. dx.doi.org/10.1021/jf205258f.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2 Ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

SILVA, V.M.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Optimization of the Enzymatic Hydrolysis of Mussel Meat. **Food Chemistry**, v. 75, n. 1, 2010. Doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01414.x.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: Propriedades – degradações – modificações**. São Paulo: Varela, 1996.

SHIYUAN, D.; MINGYONG, Z.; DONGFENG, W.; ZUNYING, L.; YUANHUI, Z.; HUICHENG, Y. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Food Chemistry**, v. 107, p. 1485–1493, 2008. Doi:10.1016/j.foodchem.2007.10.011.

SIMPSON, B. K.; NAYERI, G.; YAYLAYANA, V.; ASHIEB, I. N. A. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1/2, p. 131-138, 1998.

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

TABELA brasileira de composição de alimentos. **NEPA – UNICAMP**, Campinas, Ed. 4. P. 46-53, 2011. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/>. Acesso: 12 jun. 2013.

TAKEDA, F.; PILATTI, L. A.; FRASSON, A. C.; XAVIER, A. A. P. Aplicação do método PDCA (*Plan, Do, Check, Action*) no acompanhamento e controle de perdas: Estudo de caso do processo de desossa de coxa/sobrecoxa de frango. **Congresso Internacional de Administração**, Ponta Grossa, 2008.

TERRA, N. N. **Apontamentos sobre tecnologia de carnes**. São Leopoldo: UNISINOS, 1998, p. 216.

TORRES, B. B. **Elementos de enzimologia**. In: BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Blucher, 2001. cap. 5. p. 151 - 176.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual 2014**. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf>. Acesso em: 23 dez. 2014.

_____. União Brasileira de Avicultura. **Tipos de cortes de frango**. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br>>. Acesso em: 01 jul. 2013.

CAPÍTULO 2: OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE COPRODUTO DA DESOSSA DE FRANGO

RESUMO

As plantas de processamento de frango de todo o mundo geram grande quantidade de coprodutos sólidos na forma de cabeças, ossos, vísceras e penas. Dessa forma torna-se importante viabilizar um destino para esse material, que apresenta uma composição importante do ponto de vista proteico. O objetivo do trabalho foi otimizar o processo de hidrólise enzimática para obtenção de hidrolisado proteico a partir de coproduto da desossa de frango. O coproduto utilizado foi osso de coxa e sobrecoxa proveniente da desossa de frango, com presença de carne residual aderida. Foi utilizado o delineamento composto central rotacional (DCCR) para avaliar os efeitos da temperatura (33,2 a 66,8°C), relação enzima:substrato (0,36 a 6,36%) e tempo (39,6 a 140,4 min) sobre o grau de hidrólise. A otimização do grau de hidrólise foi conduzida por meio da função desejabilidade. As condições ótimas para a hidrólise enzimática foram temperatura (T) de 50°C, relação enzima:substrato (E:S) de 4,96% e tempo (t) de 110,16 minutos, sendo que nessas condições o grau de hidrólise médio foi de 24,21% $\pm$ 0,22. O coproduto da desossa de frango e o hidrolisado proteico obtidos nas condições ótimas foram caracterizados em termos de composição centesimal, composição de aminoácidos totais e perfil eletroforético. Os resultados para composição centesimal do coproduto da desossa de frango comprovaram que essa matéria-prima apresenta um elevado teor de proteína e que o hidrolisado proteico obtido por sua hidrólise tem potencial para suplementação proteica em alimentos, pois é fonte de aminoácidos essenciais, atendendo as recomendações estabelecidas pela FAO/WHO, exceto para leucina, fenilalanina e valina. A utilização desse coproduto da desossa de frango na suplementação proteica de alimentos agrega valor e ao mesmo tempo aumenta a competitividade dos frigoríficos.

Palavras-chave: Metodologia de superfície de resposta; Otimização de processo; Função desejabilidade; Aminoácidos essenciais; Perfil eletroforético.

ABSTRACT

The chicken processing plants worldwide produce large quantities of solid byproducts in the form of heads, bones, entrails and feathers thus becomes important to enable a use for this material, which has a major composition of view protein. The objective was to optimize the enzymatic hydrolysis process for obtaining a protein hydrolyzate from co-product of chicken bones. The co-product used was thigh and drumstick bone from the chicken bones, with residual meat attached. We used the central composite design (CCRD) and an experimental design to evaluate the effects of temperature (33.2 to 66,8°C), enzyme: substrate ratio (0.36 to 6.36%) and time (39.6 to 140.4 min) on the degree of hydrolysis. The optimization of the degree of hydrolysis was conducted using the desirability function. The optimum conditions for the enzymatic hydrolysis were temperature (T) of 50 ° C, enzyme: substrate ratio (E: S) from 4.96% to time (t) of 110.16 minutes, and the average degree of these conditions hydrolysis was of $24.21 \pm 0.22\%$. The co-product of chicken bones and the protein hydrolyzate obtained in optimum conditions were characterized in terms of chemical composition, total amino acid composition and pattern. The results for the chemical composition of the coproduct chicken bones showed that this raw material has a high protein content and the protein hydrolyzate obtained by hydrolysis has the potential for protein supplementation of foods, because it is a source of amino acids, the recommendations given set by FAO / WHO, except for leucine, phenylalanine and valine. The use of this chicken boning of coproduct in protein supplementation of food adds value to this coproduct increasing the competitiveness of slaughterhouses.

Keywords: response surface methodology; Process optimization; Desirability function; Essential amino acids ; Electrophoretic profile .

2.1 INTRODUÇÃO

As enzimas proteolíticas são empregadas para hidrolisar a proteína do alimento, resultando na formação de duas fases uma insolúvel, geralmente utilizada em ração animal; e outra solúvel, rica em proteína hidrolisada e que pode ser convertida em ingrediente para ser incorporado em alimentos processados (KUROZAWA; PARK; HUBINGER, 2009).

De acordo com a literatura, os hidrolisados proteicos podem ser utilizados como compostos de aromas, suplemento proteico em alimentos, substrato para fermentação, antioxidantes, compostos bioativos (aminoácidos e peptídeos) (SCHMIDT; SALAS-MELLADO, 2008; SHIYUAN et al. 2008; KUROZAWA; PARK; HUBINGER, 2009; FU-YUAN et al. 2009, OVISSIPOUR et al., 2013, OLIVEIRA; FRANZEN; TERRA, 2014).

Os frigoríficos de frango de todo o mundo geram grande quantidade de coprodutos sólidos na forma de cabeças, ossos, vísceras e penas, geralmente, transformados em ração animal. A utilização de métodos que fazem uso desses componentes biológicos para a elaboração de produtos de valor agregado ao invés do uso direto do coproduto, pode ser uma opção viável de aproveitamento. Portanto, existem pesquisas sobre esses coprodutos como fontes de hidrolisados de proteínas, enzimas e ácidos graxos poli-insaturados. (LASEKAN; BAKAR; HASHIM, 2013).

Neste contexto, o objetivo trabalho é otimizar o processo de hidrólise enzimática de coproduto da desossa de frango e caracterizar o hidrolisado quanto a composição centesimal, aminoácidos totais e perfil eletroforético.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material

2.2.1.1 Matéria-prima

Para realização do presente trabalho foi utilizado o coproduto da desossa de frango (*Gallus gallus domesticus*). O coproduto utilizado foi osso de coxa e sobrecoxa proveniente da desossa com presença de carne residual aderida. A matéria-prima (Figura 2.1) foi fornecida pelo frigorífico de aves da Brasil Foods, localizado em Chapecó-SC.

Figura 2.1: Coproduto da desossa de frango



Fonte: A autora.

2.2.1.2 Enzima

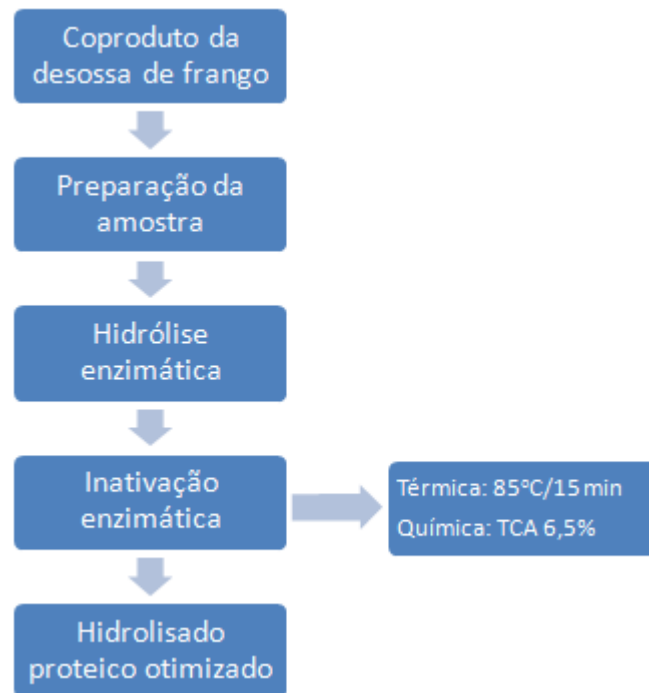
Para a hidrólise enzimática foi utilizada a protease Protamex® (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca), com atividade declarada de 1.5 AU/g. A enzima foi fornecida pela Tovani Benzaquen Ingredientes, localizada em São Paulo-SP.

2.2.2 Métodos

2.2.2.1 Obtenção do hidrolisado proteico

As etapas para obtenção do hidrolisado proteico podem ser visualizadas na Figura 2.2.

Figura 2.2 Fluxograma para obtenção do hidrolisado proteico



Fonte: Adaptado de Schmidt e Salas-Mellado (2008).

Para a preparação da amostra, os ossos de coxas e sobrecoxas de frango com carne residual foram descongelados por 24 horas em geladeira na temperatura de 4°C conforme apresentado na Figura 2.3.

Figura 2.3: Descongelamento da amostra



Fonte: A autora.

2.2.2.2 Planejamento experimental e otimização

O planejamento experimental foi realizado para estudar os efeitos da temperatura (T), relação enzima:substrato (E:S) e tempo (t) de hidrólise, sobre o grau de hidrólise (GH) a partir de coproduto da desossa de frango conforme Tabela 2.1.

Os pontos axiais foram calculados tendo os valores máximo (+1,68), mínimo (-1,68) e o ponto central (0). As variáveis testadas foram codificadas de acordo com a Equação (2.1):

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i}$$

$$\Delta X_i$$

Equação (2.1)

Onde x_i é o valor codificado e X_i é o valor real da variável independente, X_0 é o valor real do ponto central e ΔX_i é o valor da diferença entre os pontos.

Tabela 2.1: Valores utilizados no delineamento composto rotacional (DCCR) para as variáveis independentes

Variáveis independentes	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (°C)	33,2	40	50	60	66,8
Enzima:Substrato (%)	0,36	1	3	5	6,36
Tempo (minutos)	39,6	60	90	120	140,4

Para o primeiro ponto axial da relação enzima:substrato foi utilizado 0,36% por ser um valor positivo, sendo que o -1,68 foi substituído por -0,79. Pois ao aplicar -1,68 o valor foi de -0,36%, portanto, com a concentração negativa seria impossível realizar o experimento.

Foi utilizado o delineamento composto central rotacional (DCCR), com 3 pontos centrais (nível 0) e 6 pontos axiais (níveis $\pm a$), totalizando 17 ensaios mostrados na Tabela 2.2. Os intervalos estudados para as variáveis independentes foram baseados em condições trabalhadas por diferentes pesquisadores (Silva *et al.*, 2010; Schmidt; Salas-Mellado, 2008; Kurozawa, 2008 e pela fabricante da enzima Novozymes, 2013).

Tabela 2.2: Valores codificados e reais dos ensaios para a hidrólise enzimática

Ensaio	Variáveis independentes					
	Codificado			Real		
	T (°C)	E/S (%)	t (min)	T (°C)	E/S (%)	t (min)
1	-1	-1	-1	40	1	60
2	-1	-1	1	40	1	120
3	-1	1	-1	40	5	60
4	-1	1	1	40	5	120
5	1	-1	-1	60	1	60
6	1	-1	1	60	1	120
7	1	1	-1	60	5	60
8	1	1	1	60	5	120
9	-1,68	0	0	33,2	3	90
10	1,68	0	0	66,8	3	90
11	0	-0,79	0	50	0,36	90
12	0	1,68	0	50	6,36	90
13	0	0	-1,68	50	3	39,6
14	0	0	1,68	50	3	140,4
15	0	0	0	50	3	90
16	0	0	0	50	3	90
17	0	0	0	50	3	90

T: Temperatura em °C. E/S: relação enzima/substrato em %. T: tempo em minutos.

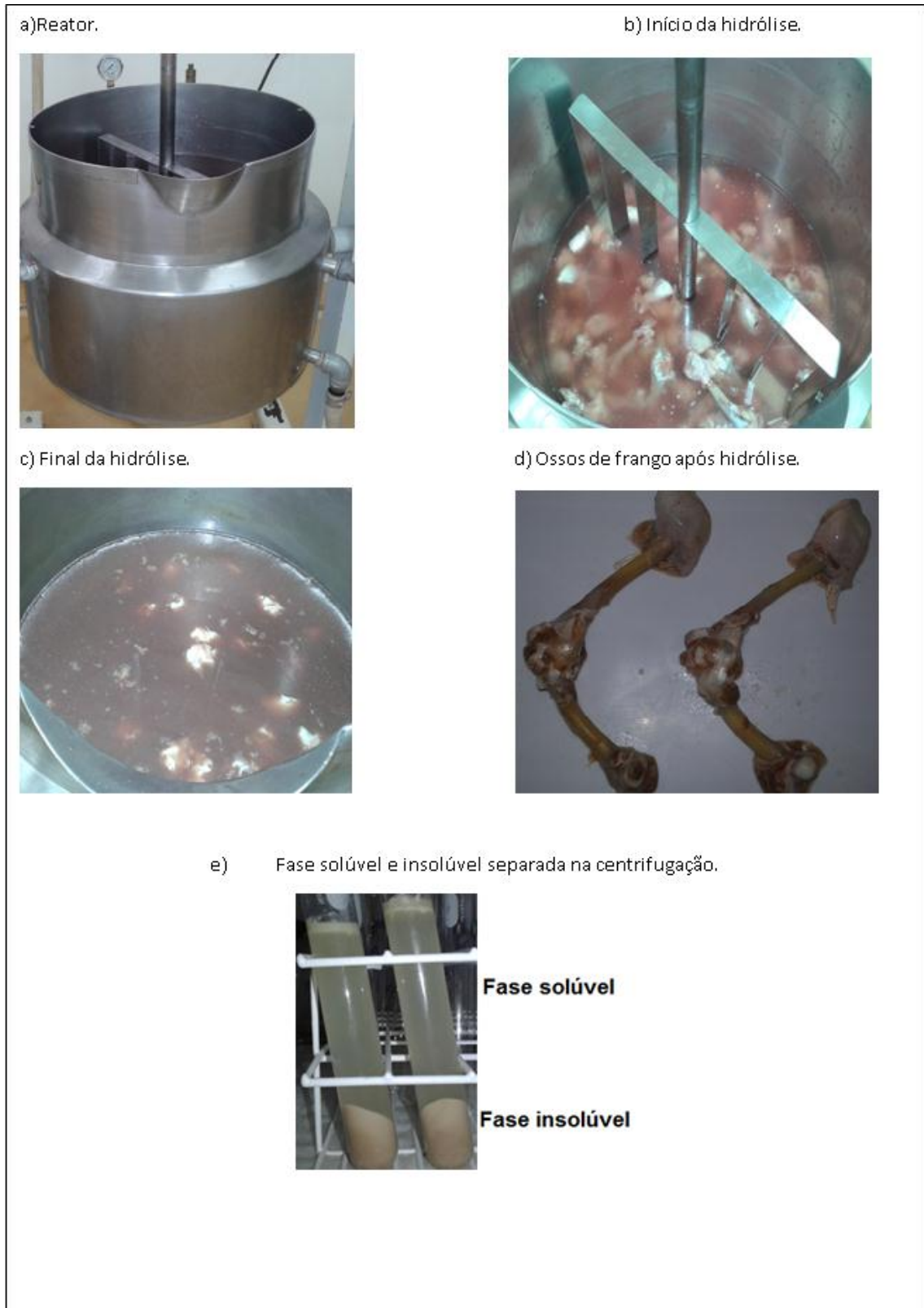
Para a elaboração dos modelos, foi utilizado o *software Statistica 7.0* (Statsoft, Tulsa, EUA), com a finalidade de assegurar a validade dos coeficientes dentro de um nível de confiança de 95%, por meio de análises estatísticas. Após a análise estatística dos coeficientes, foi realizada análise de variância (ANOVA), que consiste na avaliação do coeficiente de determinação ajustado e falta de ajuste e do teste F, verificando se o modelo linear apresenta um ajuste adequado dos dados experimentais.

A otimização da hidrólise enzimática foi realizada por meio da metodologia da função de desejabilidade descrita por Derringer; Suich (1980), de modo a obter maior valor de grau de hidrólise utilizado o *software Statistica 7.0* (Statsoft, Tulsa, EUA).

2.2.2.3 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada em um reator (Marca Sotronic, Modelo ST 50) com agitação constante, encamisado e com temperatura controlada (Figura 2.4^a). Os ensaios foram conduzidos em triplicata de acordo com os parâmetros estabelecidos no planejamento experimental: temperatura (T), concentração enzima/substrato (E/S) e tempo (t) de hidrólise (Tabela 2.2). Para cada um dos 17 ensaios do planejamento experimental foram utilizados 1 kg de ossos de coxa e sobrecoxa, provenientes da desossa de frango, para 3L de água, resultando na proporção de substrato:água de 1:3 m/v, em pH 7. Em seguida, foi realizado o aquecimento até a temperatura específica para cada ensaio, adicionada a enzima Protamex[®] de acordo com as proporções de cada ensaio e iniciada a contagem do tempo de hidrólise (Figura 2.4b). Finalizada a hidrólise, foi realizada a inativação da enzima por aquecimento da mistura a 85°C por 15 minutos (Figura 2.4c). Na sequência, os ossos foram descartados e o líquido centrifugado (Figura 2.4d). A centrifugação da fase líquida foi realizada na centrífuga, (Marca ITR Instrumentos para Laboratórios, Modelo 8BTF) à 3.000 rpm por 20 minutos, sendo essa etapa fundamental para a separação da parte solúvel (hidrolisado) da insolúvel (subproduto) (Figura 2.4e).

Figura 2.4: Etapas da hidrólise enzimática do coproduto de frango



Fonte: A autora.

2.2.2.4 Grau de hidrólise

Finalizado o tempo de hidrólise enzimática, alíquotas de 1 mL de hidrolisado (fase solúvel) foram inativadas pela adição de 9 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 6,5% e deixadas em repouso por 10 minutos para inativação enzimática. Após filtração em papel qualitativo Whatman nº 40, para remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA (Figura 2.5). Foi determinado o teor de proteínas solúveis no filtrado pelo o método de Folin-Lowry, expresso em mg de albumina descrito por Lowry *et al.* (1951). As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis (Marca Pró-Análise, Modelo V-1200) à 650 nm.

Figura 2.5: Hidrolisado proteico antes e após a aplicação do TCA



Fonte: A autora.

O grau de hidrólise (GH%) foi estimado segundo o método descrito por Hoyle e Marrit (1994) e por Baek e Cadwallader (1995), sendo expresso como a porcentagem de proteínas solúveis no TCA em relação à quantidade de proteína inicial total, e calculado segundo a Equação (2.2):

$$\text{GH (\%)} = \frac{\text{Proteína solúvel em TCA}}{\text{Proteína total da amostra}} * 100$$

Equação (2.2)

A proteína total da amostra foi determinada pelo método de Kjeldahl, com fator de conversão de 6,5, de acordo com a metodologia oficial do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1999).

2.2.2.5 Análises físico-químicas

2.2.2.5.1 Composição centesimal

Foi avaliada a composição centesimal do coproduto de frango e do hidrolisado proteico. As seguintes determinações foram realizadas: umidade pelo método de gravimétrico a 105°C, cinzas pelo método de incineração em mufla a 550°C, proteínas pelo método de Kjeldahl (fator de conversão 6,5) e lipídios pelo método de Soxhlet (AOAC, 1995).

2.2.2.5.2 Aminoácidos totais

Inicialmente, as amostras sofreram hidrólise ácida com HCl 6 N/fenol 0,1%, a 110°C por 20 horas, de acordo com método Pico-Tag descrito por White, Hart e Fry (1986). Em seguida, realizou-se a derivatização das amostras com 20 mL de solução de etanol: água: trietilamina: fenilisotiocianato (7:1:1:1, v/v) por 20 minutos a temperatura ambiente. Após a derivatização na pré-coluna, os aminoácidos foram

identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna de fase reversa, Anexo 1, (modelo PCX 3100, Pickering Laboratories, Mountain View, EUA).

O conteúdo de triptofano foi determinado após a hidrólise enzimática das amostras com pronase a 40°C durante 24 horas, seguida de reação colorimétrica com solução de p-metilamino benzaldeído, em ácido sulfúrico 21,2 N, a temperatura ambiente por 6 horas. A leitura foi realizada a 590 nm utilizando um espectrofotômetro (Bechman Coulter, modelo DU640, Fullerton, EUA) e a quantificação do aminoácido feita com base em uma curva padrão de triptofano, Anexo 1, (SPIES, 1967).

2.2.2.5.3 Perfil eletroforético

O perfil de massa molecular foi obtido utilizando-se a técnica de eletroforese. O coproduto da desossa de frango foi preparado na concentração de 4 mg/mL de proteína em tampão redutor (com β -mercaptoetanol) e o hidrolisado na concentração de 10 mg/mL no mesmo tampão. Foram utilizados 2 sistemas diferentes para resolução das frações protéicas.

Sistema I (sistema SDS-PAGE): gel de resolução (gradiente de 8-17,5% de acrilamida) e gel de empilhamento com 4%, segundo metodologia descrita por LAEMMLI (1970). Corrida em 120 V utilizando gel com 1,5 mm de espessura. Nesse sistema, foi utilizado padrão da Bio-Rad (16-0375) com as seguintes frações protéicas (kDa): 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 e 10. O padrão foi identificado por P1.

Sistema II (sistema SDS-PAGE-Tricina): gel de resolução com 16% de acrilamida (16%T; 3%C), gel espaçador com 10% de acrilamida e gel de empilhamento com 4% de acrilamida, segundo metodologia descrita por SCHAGGER e JAGOW (1987). A corrida foi realizada em 75 V utilizando gel com 1,5 mm de espessura. Nesse sistema, foi utilizado padrão Bio Rad (161-0326), contendo as seguintes frações protéicas: triosefosfato isomerase (26.625 Da), mioglobina (16.950 Da), α -lactalbumina (14.437 Da), aprotinina (6.512 Da), insulina cadeia B (3.496 Da) e bacitracina (1.423 Da). O padrão foi identificado por P2.

2.2.2.5.4 Análise estatística

Para os resultados das análises centesimais e a diferença entre o valor teórico e o valor experimental otimizado foram calculadas a média, desvio padrão e o teste de diferença de médias de duas amostras por meio do *t-Student* utilizando o programa computacional Action 2.7 da Microsoft Excel® (Microsoft Co.)

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Hidrólise enzimática

2.3.1.1 Planejamento experimental

Os valores obtidos para o grau de hidrólise utilizando o coproduto da desossa de frango como substrato para a hidrólise enzimática estão apresentados na Tabela 2.3. Os dados experimentais foram obtidos aplicando 17 combinações diferentes das seguintes variáveis independentes: temperatura, enzima:substrato e tempo. O grau de hidrólise médio variou entre $2,29\% \pm 0,39$ e $24,21\% \pm 0,22$. Os pontos centrais apresentaram uma variação pequena, indicando uma boa repetibilidade do processo.

Oliveira; Franzen e Terra (2014) avaliaram o grau de hidrólise utilizando três enzimas diferentes na hidrólise enzimática de CMS (carne mecanicamente separada) de frango. No final da hidrólise (120 minutos), foram observados valores de 66%, 29% e 61% de grau de hidrólise para papaína, Flavourzyme e Protamex®, respectivamente. De acordo com os autores, os níveis elevados de grau de hidrólise para Papaína e Protamex® sugerem que estas têm maior afinidade pelo substrato e, portanto, são mais eficientes que a Flavourzyme.

Tabela 2.3: Valores codificados e reais das variáveis independentes para os ensaios de hidrólise enzimática e grau de hidrólise como variável independente

Ensaio	Variáveis independentes						Variável dependente
	Codificado			Real			GH (%)
	T (°C)	E/S (%)	t (min)	T (°C)	E/S (%)	t (min)	
1	-1	-1	-1	40	1	60	3,72 ± 0,20
2	-1	-1	1	40	1	120	4,33 ± 0,15
3	-1	1	-1	40	5	60	8,44 ± 0,14
4	-1	1	1	40	5	120	10,25 ± 0,22
5	1	-1	-1	60	1	60	2,29 ± 0,39
6	1	-1	1	60	1	120	3,57 ± 0,20
7	1	1	-1	60	5	60	7,64 ± 0,11
8	1	1	1	60	5	120	8,93 ± 0,13
9	-1,68	0	0	33,2	3	90	3,01 ± 0,15
10	1,68	0	0	66,8	3	90	5,80 ± 0,08
11	0	-0,79	0	50	0,36	90	4,37 ± 0,09
12	0	1,68	0	50	6,36	90	24,21 ± 0,22
13	0	0	-1,68	50	3	39,6	12,02 ± 0,09
14	0	0	1,68	50	3	140,4	20,25 ± 0,06
15	0	0	0	50	3	90	16,89 ± 0,34
16	0	0	0	50	3	90	16,57 ± 0,45
17	0	0	0	50	3	90	16,14 ± 0,24

T: Temperatura em °C. E/S: relação enzima/substrato em %. T: tempo em minutos.

Schmidt e Salas-Mellado (2009) estudaram a influência da ação das enzimas Alcalase e Flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de peito e coxa de frango. Segundo os autores, ao utilizar a enzima Alcalase, o grau de hidrólise apresentou uma variação de 20, 93 a 57,42% para o peito de frango e de 18,62 a 38,79% para coxa de frango. Os valores obtidos para o grau de hidrólise utilizando a enzima Flavourzyme em peito de frango variaram de 17,22 a 40,47% e de 8,30 a 22,54% com a coxa de frango. Os autores constataram que quando se utilizou coxa de frango como substrato obtiveram-se, na maioria dos ensaios com Alcalase, valores menores de grau de hidrólise quando comparados aos hidrolisados de peito. Já para a Flavourzyme, todos os ensaios realizados com coxa de frango apresentaram valores menores de grau de hidrólise do que com peito de frango, verificando uma diferença bem mais acentuada do que a observada nos ensaios com alcalase.

Os valores de grau de hidrólise obtidos no trabalho são inferiores aos descritos na literatura, porém, isso é absolutamente compreensível por tratar-se de um coproduto da desossa de frango. Entretanto, os estudos similares encontrados na literatura, geralmente, realizam a moagem e homogeneização das amostras, aumentando a superfície de contato do substrato com a enzima. Porém, a hidrólise enzimática foi conduzida com os resíduos de carne da coxa e sobrecoxa aderidos aos ossos para simular um processo industrial, passando direto para etapa de hidrólise enzimática, evitando o processo de moagem que poderia gerar mais custos para as indústrias.

Os efeitos da temperatura, relação de enzima:substrato e do tempo de hidrólise enzimática sobre o grau de hidrólise e os parâmetros estatísticos do modelo são apresentados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4: Efeitos da Temperatura (T), Concentração de (E/S) e Tempo (t) para o grau de hidrólise (GH) de coproduto de frango.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t-valor	p-valor	-95% confiança	95% confiança
T (°C) (L)	5,22	0,11	47,04	<0,001	4,75	5,70
T (°C) (Q)	-0,05	0,001	-47,21	<0,001	-0,06	-0,05
E/S (%) (L)	5,64	0,21	26,73	0,001	4,73	6,55
E/S (%) (Q)	-0,57	0,03	-17,65	0,003	-0,71	-0,43
t (min) (L)	0,26	0,02	11,56	0,007	0,16	0,35
t (min) (Q)	-0,001	<0,001	-9,62	0,01	-0,002	-0,001
R ²	0,7964					
R ² ajustado	0,6743					
p valor (modelo)	<0,001					
p valor (normalidade dos resíduos)	0,75					

Um modelo polinomial de segunda ordem foi proposto para explicar o grau de hidrólise (GH) segundo a Equação 2.3:

$$\text{GH (\%)}: -139,60 + 5,22 \times T - 0,05 \times T^2 + 5,64 \times \text{ES} - 0,57 \times \text{ES}^2 + 0,26 \times t - 0,001 \times t^2$$

Equação (2.3)

onde o GH é o grau de hidrólise em %, T é a temperatura em °C, ES é a concentração de enzima:substrato em % e t é o tempo em minutos.

O modelo ajustado foi significativo (p -valor = $<0,001$) e o coeficiente de determinação R^2 foi de 0,7964 e o R^2 ajustado foi de 0,6743 para o grau de hidrólise, indicando que o modelo ajustado explica 67,43% do total de variação. Utilizando a análise de variância, a significância e adequação do modelo da superfície de resposta (Tabela 2.4) puderam ser avaliados, e para todos os casos, os valores de p menores 0,05 foram atingidos, o que indica que a equação matemática proposta para explicar cada variável resposta foi satisfatória. Além disso, o valor de R^2 foi $>60\%$ e de acordo com Granato et. al. (2014) esse valor significa que a maior parte da variabilidade nos dados experimentais poderia ser explicado pelo modelo matemático de segunda ordem.

De um ponto de vista prático, valores elevados R^2 nem sempre são fáceis de ser obtidos quando uma reação bioquímica deve encaixar-se em uma equação matemática, uma vez que um modelo mais robusto é necessário ou mesmo nenhum modelo é possível para certas respostas. A ideia principal da regressão múltipla obtida pela metodologia de superfície de resposta é comprimir os dados em uma equação que relaciona os fatores independentes (temperatura, E/S e tempo, por exemplo) em uma maneira de explicar de forma abrangente os fenômenos sob investigação, para tentar explicar o máximo de informação possível e testar a adequação desses modelos preditivos para utilizar em futuras aplicações (GRANATO et. al., 2014).

As Figuras 2.6 (a; b) mostram as superfícies de resposta e gráficos de contorno gerados pelo modelo proposto. Os gráficos expressam a interação entre as duas variáveis independentes, onde a terceira variável foi mantida no ponto central. Os gráficos de contorno servem para definir a melhor região de máximo grau de hidrólise.

Na Figura 2.6 (a) observa-se que há uma tendência quadrática entre a temperatura e a variável dependente, com aumento no grau de hidrólise até 50°C.

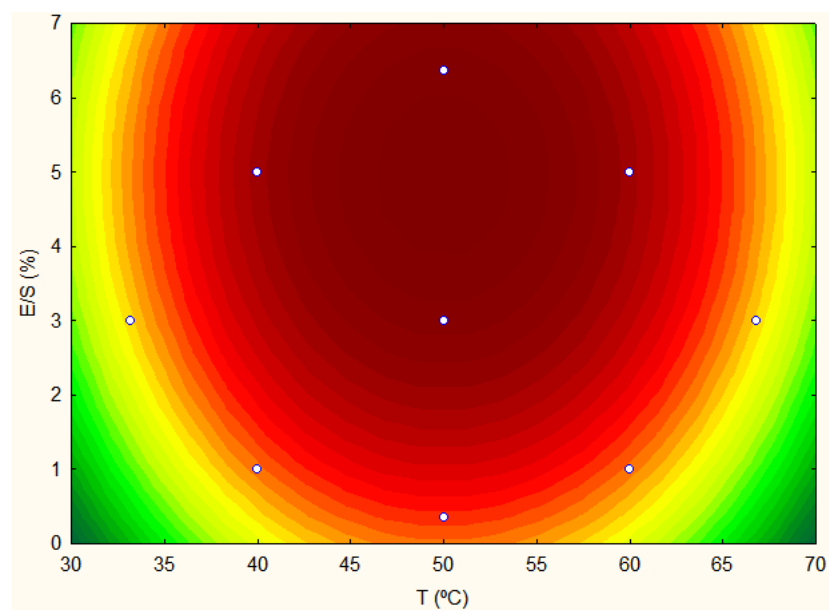
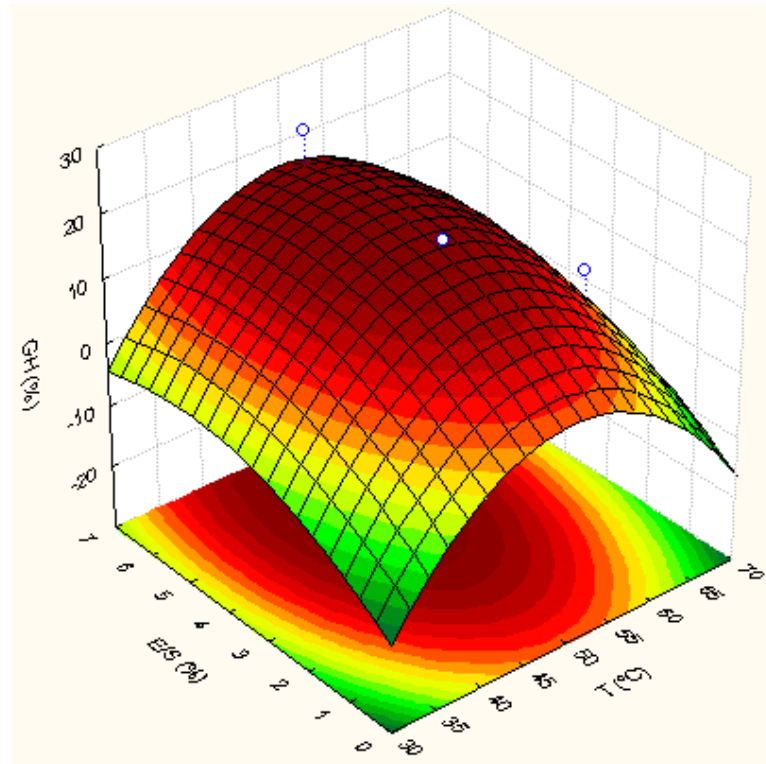
Em temperaturas mais elevadas, foi possível verificar um decréscimo no grau de hidrólise. De acordo com Kurozawa; Park; Hubinger (2008) isso pode ter ocorrido devido a desnaturação térmica da estrutura da protease, reduzindo a sua atividade enzimática. Comportamento semelhante foi observado para hidrólise enzimática com outras fontes de proteína alimentar, tais como, em peito de frango aplicando a enzima Alcalase[®] (Kurozawa; Park; Hubinger 2008), em salmão aplicando a enzima Protamex[®] (Liaset, et. al 2002) e em mexilhão aplicando a enzima Protamex[®] (Silva; Park e Hubinger 2010).

Em relação a concentração de enzima:substrato, foi observado um efeito positivo para o grau de hidrólise Figura 2.6 (a). Aumentando a concentração de enzima, ocorreu um aumento no grau de hidrólise. Segundo Kurozawa; Park e Hubinger (2008) com uma concentração de enzimas maior havia mais sítios ativos disponíveis para hidrolisar o substrato, resultando em maior clivagem das ligações peptídicas e, conseqüentemente, maior dissolução das proteínas.

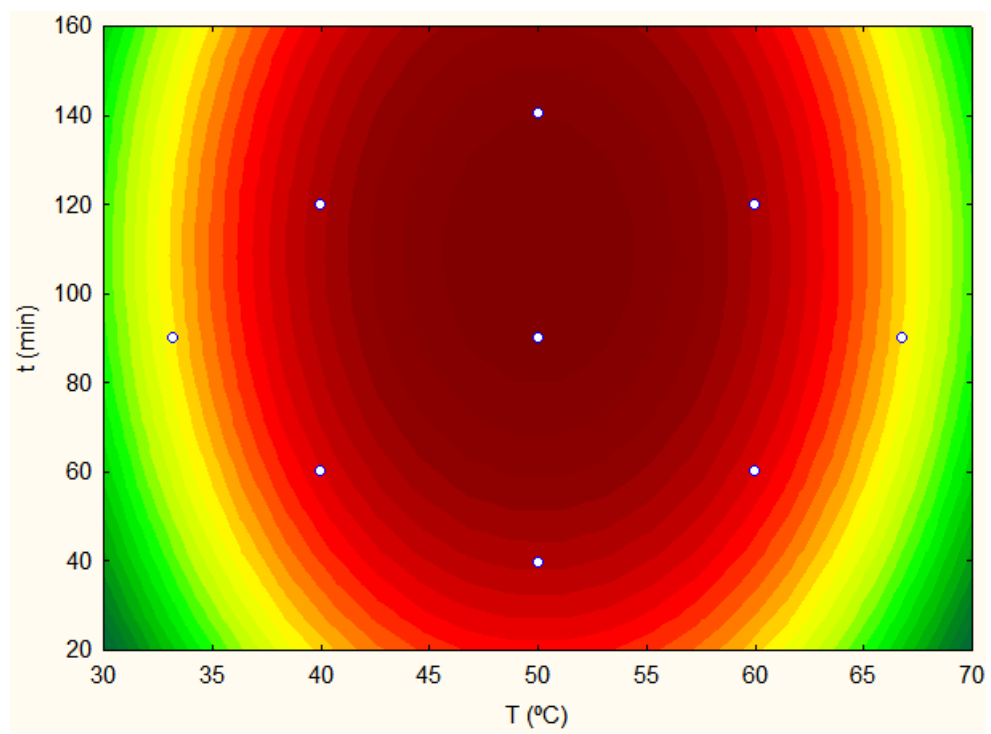
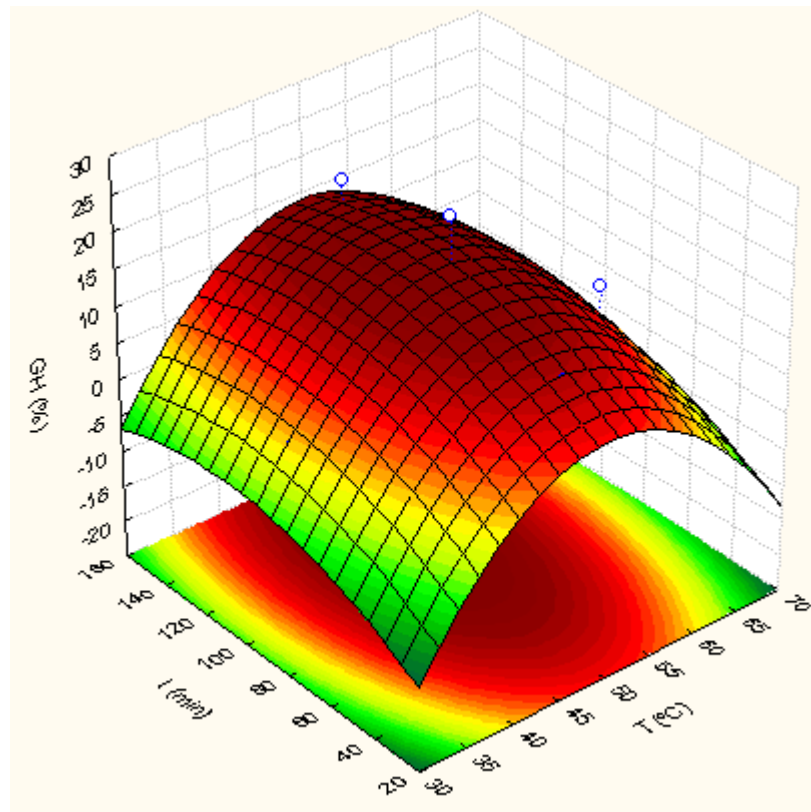
No Figura 2.6 (b) foi possível analisar que quanto maior o tempo de hidrólise enzimática, maior foi o grau de hidrólise obtido. Entretanto, Oliveira; Franzen e Terra (2014) realizaram a hidrólise enzimática com as enzimas papaína, Flavourzyme e Protamex[®] em CMS (carne mecanicamente separada) de frango e verificaram que para as enzimas Flavourzyme e Protamex[®] não houve aumento significativo do grau de hidrólise após 45 minutos de hidrólise enzimática.

Figura 2.6: Superfície de resposta e gráficos de contorno para o grau de hidrólise em função da concentração de enzima/substrato (E/S) e temperatura (T) (a) e do tempo (t) e da temperatura (T) (b).

(a)



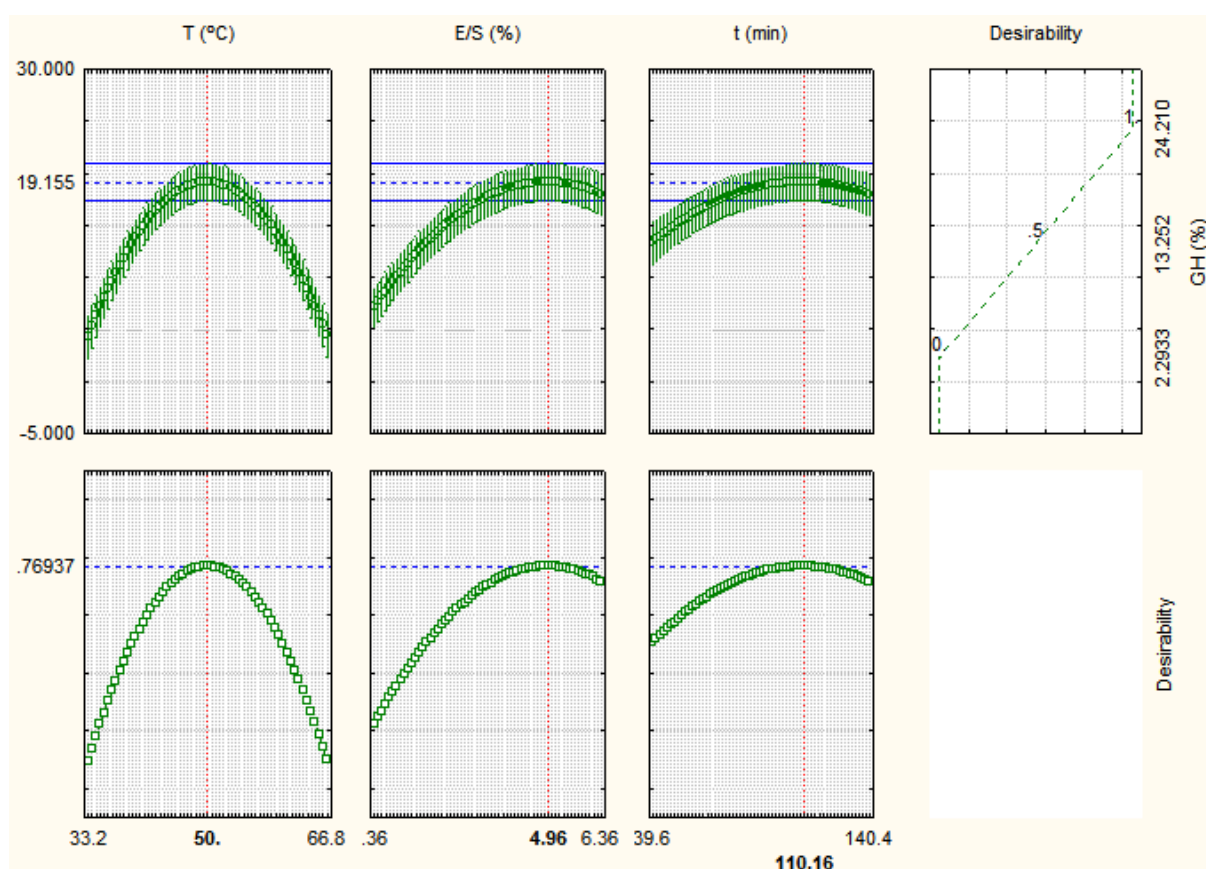
(b)



2.3.1.2 Otimização

A otimização do grau de hidrólise foi conduzida por meio da função desejabilidade. O valor teórico do ponto ótimo para a variável dependente, grau de hidrólise (GH), foi de 24,21%. As condições operacionais que levariam ao ótimo da resposta foram temperatura (T) de 50°C, concentração de enzima/substrato (E/S) de 4,96% e tempo (t) de 110,16 minutos, Figura 2.7.

Figura 2.7: Otimização do grau de hidrólise de coproduto da desossa de frango



O teste de validação foi realizado para verificar a adequação do modelo proposto (Tabela 2.5). De acordo com o modelo, o resultado preditivo para o grau de hidrólise foi de $24,21\% \pm 0,22$, próximo ao resultado experimental de $22,92\% \pm 0,34$. O erro absoluto (Equação 2.4) foi de 5,33% para o grau de hidrólise e esse valor deve estar abaixo de 10%, portanto, o modelo pode ser utilizado para fins preditivos.

$$\text{Erro absoluto (\%)} = \frac{(\text{Valor experimental} - \text{Valor teórico})}{\text{Valor teórico}} * 100$$

Equação (2.4)

Tabela 2.5: Resultados teórico e experimental obtidos nas condições otimizadas para o grau de hidrólise

Variáveis de resposta	Resultado teórico (%) média ± d.p*	Resultado experimental (%) média ± d.p*
Grau de hidrólise (GH)	24,21 ^a ± 0,22	22,92 ^a ± 0,34
p-valor		0,07
Erro absoluto (%)		5,33%

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste *t-Student* (p≤0,05).

*d.p = desvio padrão.

Na literatura podemos encontrar resultados similares. Silva; Park e Hubinger (2010) avaliaram a hidrólise enzimática de mexilhão utilizando a enzima Protamex[®]. A relação da temperatura (46 a 64 °C), relação de enzima:substrato (0,48 a 5,52%) e pH (6,7 a 8,3) foram avaliados. As condições ótimas para a hidrólise enzimática obtidas pela metodologia de superfície de resposta foram temperatura 51 °C, relação de enzima e substrato 4,5% e pH 6,85. Os autores realizaram o teste de validação experimental para determinar a adequação do método proposto. De acordo com os autores o modelo, os resultados preditivos para o grau de hidrólise e recuperação de proteína foram de 26,5% e 65%, respectivamente, próximo ao resultado experimental de 28,3% e 64,4%, com um erro relativo de 6,6% e 0,9% para o grau de hidrólise e recuperação de proteína.

No estudo conduzido por Kurozawa; Park e Hubinger (2008) foi realizada a hidrólise enzimática de peito de frango aplicando a protease Alcalase[®]. Foram avaliadas a influência da temperatura (43 a 77°C), a relação de enzima e substrato (0,8% a 4,2%) e pH (7,16 a 8,84) sobre as respostas de grau de hidrólise e recuperação de proteína. A hidrólise enzimática foi otimizada para obter o máximo

grau de hidrólise e recuperação de proteína utilizando a metodologia de superfície de resposta. As condições ótimas determinadas foram: temperatura 52,5 °C, relação enzima:substrato 4,2% e pH 8,0. De acordo com o modelo, o resultado preditivo para as condições ótimas foram de 33,8% e 94,4%, para o grau de hidrólise e recuperação de proteína, respectivamente, próximo ao resultado experimental de 31% e 91%. Apresentou um erro relativo de 8,7% e 3,7% para o grau de hidrólise e recuperação de proteína, respectivamente.

2.3.2 Análises físico-químicas

2.3.2.1 Composição centesimal

Os resultados da caracterização centesimal do coproduto da desossa de frango e do hidrolisado proteico otimizado estão apresentados na Tabela 2.6.

Tabela 2.6: Composição centesimal do coproduto de frango e do hidrolisado proteico

Análise	Coproduto de frango bu* (%) média ± d.p**	Hidrolisado proteico bu* (%) média ± d.p**
Umidade	72,13 ^a ± 1,11	92,73 ^b ± 0,34
Proteína	15,06 ^a ± 0,56	5,32 ^b ± 0,40
Lipídios	10,20 ^a ± 0,31	1,11 ^b ± 0,12
Cinzas	0,94 ^a ± 0,24	0,77 ^b ± 0,11

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste *t-Student* ($P \leq 0,05$).

*b.u = base úmida. **d.p = desvio padrão.

Na caracterização centesimal do coproduto da desossa de frango foi verificado que o teor de lipídios foi de 10,20%. De acordo com Schmidt e Salas-Mellado (2009) o maior teor de lipídios, pode ter dificultando a ação da enzima sobre as proteínas.

Comportamento similar foi observado no estudo realizado por Slyztye et. al (2005) que avaliaram a composição de diferentes frações obtidas após hidrólise enzimática de coprodutos de bacalhau (*Gadus morhua*) aplicando as enzimas Flavourzyme e Neutrase. Os autores observaram que uma matéria-prima que contém elevada quantidade de lipídios resultava em um hidrolisado com menor quantidade de proteína solubilizada. Segundo os autores a quantidade de lipídios na matéria-prima influencia o processo de hidrólise enzimática, pois uma quantidade

alta poderia formar complexos proteína/lipídio, tornando-se mais resistente ao processo de hidrólise enzimática. Portanto, tratando-se de um coproduto de frango os resultados para o grau de hidrólise foram adequados.

Schmidt e Salas-Mellado (2008) ao avaliarem a composição centesimal de coxa de frango obtiveram 16,82% para proteína, lipídios 3,34%, cinzas 0,90% e umidade 77,56%. Os valores obtidos para a composição centesimal para o coproduto de frango correspondem aos valores encontrados na literatura, exceto para os teores de proteínas e lipídios. Provavelmente esse resultado é devido a característica do coproduto de frango utilizado, tendo em vista que a quantidade de carne aderida nos ossos é reduzida, logo as proporções de proteínas e lipídios podem variar, quando comparado com a carne de coxa e sobrecoxa de frango.

Em relação aos resultados obtidos para o hidrolisado proteico foi possível observar que o teor de umidade foi de 92,73 e o aumento na umidade provavelmente ocorreu pela adição de água para efetuar a hidrólise enzimática. Quanto ao teor de proteína foi obtido 5,32% para o hidrolisado proteico, tendo em vista que é o valor obtido após a centrifugação, ou seja, da parte solúvel.

O teor médio de lipídios totais foi de 1,11%, valor menor ao do coproduto de frango que apresentou 10,20%. De acordo com Kurozawa; Park; Hubinger (2009) o teor de lipídios no hidrolisado pode ter sido menor devido a etapa de centrifugação após a reação enzimática, auxiliando na diminuição desse componente. Essa redução pode contribuir substancialmente para a minimização da taxa de oxidação lipídica, e, conseqüentemente, na manutenção da estabilidade e da qualidade sensorial do produto.

Resultados similares foram obtidos no estudo realizado por Kurozawa; Park; Hubinger (2009) que elaboraram um hidrolisado protéico a partir de peito de frango utilizando a enzima Alcalase, a caracterização centesimal do hidrolisado proteico desenvolvido pelos autores apresentou teores de umidade, proteína, lipídios e cinzas de 91,32%, 7,05%, 0,08% e 0,68%, respectivamente.

Diante do exposto, tratando-se de um coproduto gerado durante a desossa de frango nos frigoríficos, os resultados obtidos na composição centesimal para a

matéria-prima e para o hidrolisado proteico foram satisfatórios. Esses resultados comprovam que essa matéria-prima apresenta um elevado teor de proteína e pode ser utilizada para obtenção de hidrolisado proteico, podendo dessa forma, agregar valor ao coproduto da desossa de frango e aumentar a competitividade das indústrias.

2.3.2.2 Aminoácidos totais

Os resultados da composição de aminoácidos totais do coproduto da desossa de frango e do hidrolisado proteico otimizado podem ser visualizados na Tabela 2.7. Foram observadas variações na composição de aminoácidos do coproduto de frango em relação ao hidrolisado proteico. Esse resultado pode ser decorrente da distribuição variável dos aminoácidos entre o hidrolisado e o resíduo proteico insolúvel (NEVES, MIRA E MARQUES, 2004). A inativação enzimática realizada ao final do processo de hidrólise por meio de tratamento térmico também pode ter contribuído para a variação dos aminoácidos (NETTO E GALEAZZI, 1998).

Tabela 2.7: Composição de aminoácidos totais (g/100g de proteína) do coproduto de frango e do hidrolisado proteico

Aminoácidos totais	Coproduto de frango	Hidrolisado proteico	FAO/WHO (2007)*
Não essenciais			
Alanina	3,94	2,50	
Aspargina	6,81	5,58	
Glutamina	11,05	10,26	
Arginina	4,70	1,54	
Ácido aspártico	5,72	5,10	
Cisteína	0,62	0,43	
Ácido glutâmico	6,77	6,02	
Glicina	3,67	2,22	
Prolina	3,26	3,12	
Serina	2,95	1,13	
Tirosina	1,76	1,69	
Essenciais			
Histidina	2,52	1,73	1,5
Isoleucina	3,60	3,29	3,0
Leucina	5,45	5,27	5,9
Lisina	6,23	5,77	4,5
Metionina	2,00	2,63	2,2
Fenilalanina	2,91	1,47	3,8
Treonina	3,34	2,87	2,3
Triptofano	0,92	0,68	0,6
Valina	3,46	2,53	3,9

* Referência FAO/WHO (2007) padrão de aminoácidos essenciais para adultos.

O perfil de aminoácidos essenciais do coproduto de frango e do hidrolisado proteico atende as recomendações estabelecidas pela FAO (*Food and Agriculture Organization*) / WHO (*World Health Organization*) em 2007, exceto para leucina, fenilalanina e valina. De acordo com Neves, Mira e Marques (2004) a redução na concentração de fenilalanina pode ser benéfica, quando o objetivo for a obtenção de um hidrolisado para pacientes fenilcetonúricos.

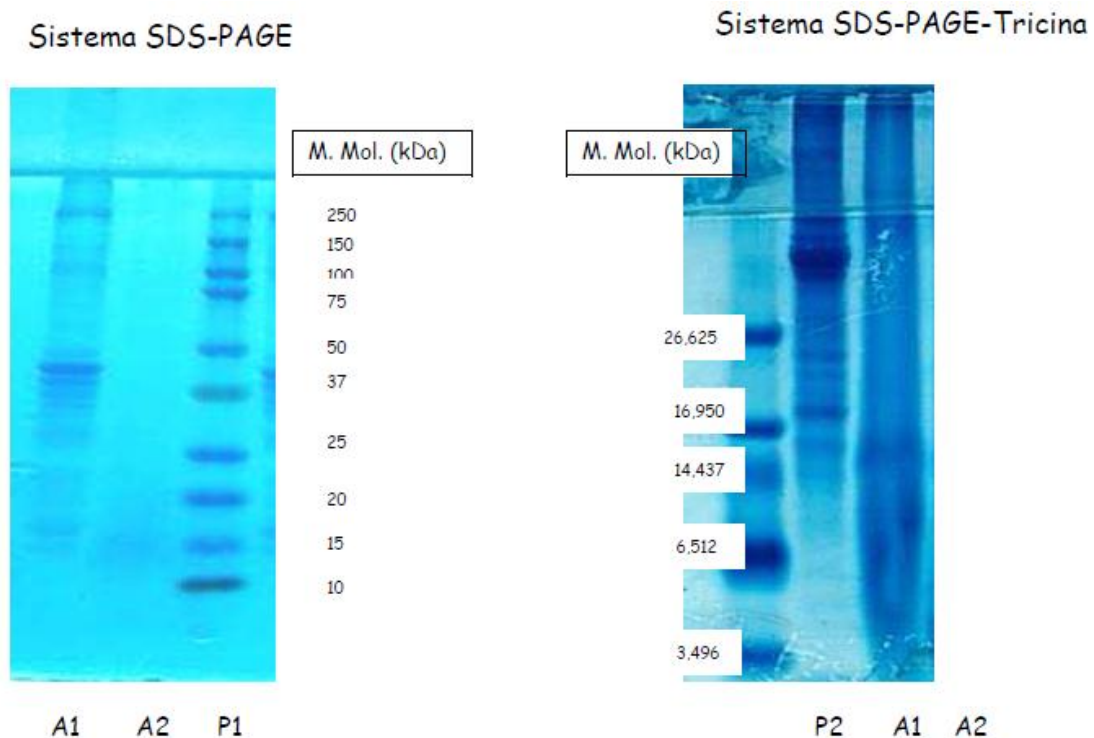
De acordo com o perfil de aminoácidos totais, é possível afirmar que o hidrolisado proteico obtido por meio da hidrólise enzimática de coproduto de frango, aplicando a enzima Protamex[®] é uma boa fonte de aminoácidos, podendo ser aplicado na suplementação proteica de alimentos, além de agregar valor ao coproduto de frango.

2.3.2.3 Perfil eletroforético

O perfil de massa molecular foi determinado por eletroforese em 2 sistemas, Figura 2.8 (a) Sistema SDS-PAGE e (b) Sistema SDS-PAGE-Tricina. Foi possível observar que frações protéicas presentes no coproduto de frango, principalmente na faixa de 200 kDa e 45 kDa, não aparecem no hidrolisado (Figura 2.8a). Na Figura 2.9b é possível observar que o hidrolisado apresenta maior concentração de frações proteicas entre 14,437 kDa e 3,496 kDa.

Kurozawa; Park; Hubinger (2008), obtiveram peso molecular abaixo de 6,5 kDa para um hidrolisado elaborado a partir de peito de frango aplicando a enzima alcalase, semelhante ao resultado obtido no presente trabalho para o hidrolisado de coproduto de frango.

Figura 2.8: Perfil eletroforético em gel do coproduto de frango e do hidrolisado proteico



- a) Perfil eletroforético em gel gradiente 8-17,5% (sistema SDS-PAGE). P1 – padrão; coproduto de frango - A1, hidrolisado proteico – A2.
 b) Perfil eletroforético em gel 16% (sistema SDS-PAGE-Tricina). P2 – padrão; coproduto de frango - A1, hidrolisado proteico – A2.

Segundo Mahmoud (1994), os hidrolisados proteicos, geralmente, são aplicados para pessoas que não conseguem digerir a proteína nativa. Aplicação dos hidrolisados varia em função da distribuição do peso molecular dos peptídeos. Assim, peptídeos com pesos moleculares entre 5 e 20 kDa são utilizados, geralmente, como fontes de nitrogênio, em alimentos para fins especiais e suplementos alimentares para adultos. Já peptídeos com pesos moleculares menores que 5 kDa são oriundos de proteínas altamente hidrolisadas sendo frequentemente utilizados em formulações hipoalergênicas.

Portanto, de acordo com o perfil eletroforético o hidrolisado desenvolvido a partir de coproduto da desossa de frango pode ser aplicado como fontes de nitrogênio em alimentos para fins especiais e suplementos alimentares para adultos, bem como em formulações hipoalergênicas.

2.4 CONCLUSÃO

- ✓ Os resultados para composição centesimal do coproduto da desossa de frango e do hidrolisado proteico foram satisfatórios. A matéria-prima apresenta um elevado teor de proteína para obtenção de hidrolisado.
- ✓ As variáveis independentes tiveram influência sobre a hidrólise enzimática de coproduto da desossa de frango.
- ✓ Foi possível otimizar o hidrolisado, sendo que as condições ótimas para a hidrólise enzimática foram temperatura de 50°C, relação enzima:substrato de 4,96% e tempo de 110,16 minutos, nessas condições o grau de hidrólise foi de 22,92% $\pm$ 0,34.
- ✓ O hidrolisado proteico é fonte de aminoácidos essenciais, atendendo as recomendações estabelecidas pela FAO/WHO exceto para leucina, fenilalanina e valina.
- ✓ O hidrolisado apresentou maior concentração de frações proteicas entre 14,437 kDa e 3,496 kDa.
- ✓ O hidrolisado proteico de coproduto da desossa de frango tem potencial para suplementação em alimento, dessa forma, agregar valor e aumentar a competitividade dos frigoríficos.

REFERÊNCIAS

- ADLER-NISSEN J. 1986. **Enzymatic hydrolysis of food protein**. London: Elsevier Applied Science Publishers. 427 p.
- AOAC. Oficial methods of analysis of the Association of Oficial analytical chemist. Editor: Horwitz W. 13th Ed. Washington, DC. 1995.
- BAEK, H. H.; CADWALLADER. K. R.; **J. Food Sci.** 1995, 60, 929.
- BENJAKUL, B.; MORRISSEY, M.T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. **J Agric Food Chem.** 45: 3423-3430.
- DERRINGER, G. AND SUICH, R. (1980), Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology** 12, 214-219.
- DINIZ, F.M.; MARTIN, A.M. 1998. Influence of process variables on the hydrolysis of shark muscle protein. **Food Sci Technol Int** 4:91–8.
- FAO/WHO] Food and Agriculture Organization/World Health Organization. 2007. Evaluation of protein quality. Joint FAO/WHO report. **FAO Food Nutrition**.
- FU-YUAN, C.; YU-TSE, L.; TIEN-CHUN, W.; LIANG-CHUAN, L.; RYOICHI, S. The development of angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from chicken bone protein. **Animal Science Journal.** v. 79, p. 122–128, 2008. Doi: 10.1111/j.1740-0929.2007.00507.x.
- FU-YUAN, C.; YU-TSE, L.; TIEN-CHUN, W.; LIANG-CHUAN, L.; RYOICHI, S. Determination of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in chicken leg bone protein hydrolysate with alcalase. **Animal Science Journal.** v. 80, p. 91–97, 2009. Doi: 10.1111/j.1740-0929.2008.00601.x
- GRANATO, D.; GREVINK, R. ZIELINSKI, A. A. F. NUNES, D. S.; VON RUTH, S. M. Analytical Strategy Coupled with Response Surface Methodology To Maximize the Extraction of Antioxidants from Ternary Mixtures of Green, Yellow, and Red Teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*). **Journal of Agricultural Food Chemistry.** 2014, 62, 10283–10296.
- Hoyle, N. T.; Merritt, J. H.; **J. Food Sci.** 1994, 59, 76.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** v. 227, n. 15, p. 685-689, 1970.
- LASEKAN, A.; BAKAR, F. A.; HASHIM, D. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. **Waste Management**, Serdang, v. 33, p. 552–565, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2012.08.001>.

LIASET, B.; NORTVEDT, R.; LIED, E.; ESPE, M. Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex™ protease. **Process Biochemistry**. v. 37, p. 1263–1269, 2002.

LOWRY ET AL., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J.Biol.Chem.**193,265-275.

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

Novozymes. **Ficha técnica Protamex®**. Bagsvaerd Denmark, 2013.

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Optimization of the Enzymatic Hydrolysis of Chicken Meat Using Response Surface Methodology. **Food Chemistry**. v. 73, n. 5, 2008. Doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00765.x.

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. 2009, 188 f. **Estudos dos processos de hidrólise enzimática e secagem por atomização para obtenção de hidrolisado proteico de frango em pó**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2009.

NETTO, F.M.; GALEAZZI, M.A.M. Production and characterization of enzymatic hydrolysate from soy protein isolate. **Lebensm-Wiss Technol.**, v.31, p.624-631, 1998.

OLIVEIRA, M. S. R; FRANZEN, F. L.; TERRA, N. N. Utilização da carne mecanicamente separada de frango para a produção de hidrolisados proteicos a partir de diferentes enzimas. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 35, n. 1, p. 291-302, jan./fev. 2014.

OVISSIPOUR, M.; RASCO, B.; SHIROODI, S. G., MODANLOW, M., GHOLAMID, S., NEMATI, M. Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. **Journal Science Food Agriculture**. v. 93, p. 1718–1726, 2013.

PLUMMER, D. T. **An Introduction to Practical Biochemistry**. McGraw-Hill Book Company (UK) Limited, 2a Edition, 1978.

SCHAGGER, H.; JAGOW, G.V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**. v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

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

SCHMIDT, C. G.; SALAS-MELLADO, M. 2008, 143 f. **Hidrólise enzimática das proteínas de carne de frango**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Departamento de Química. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

SHIYUAN, D.; MINGYONG, Z.; DONGFENG, W.; ZUNYING, L.; YUANHUI, Z.; HUICHENG, Y. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Food Chemistry**. v. 107, p. 1485–1493, 2008. Doi:10.1016/j.foodchem.2007.10.011.

SILVA, V.M.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Optimization of the Enzymatic Hydrolysis of Mussel Meat. **Food Chemistry**. v. 75, n. 1, 2010. Doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01414.x.

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

SPIES, J.R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 12, p.1412-1415, 1967.

TABELA brasileira de composição de alimentos. **NEPA – UNICAMP**, Campinas, Ed. 4. P. 46-53, 2011. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/>. Acesso: 12 jun. 2013.

TAKEDA, F.; PILATTI, L. A.; FRASSON, A. C.; XAVIER, A. A. P. Aplicação do método PDCA (Plan, Do, Check, Action) no acompanhamento e controle de perdas: Estudo de caso do processo de desossa de coxa/sobrecoxa de frango. **Congresso Internacional de Administração**, Ponta Grossa, 2008.

WHITE, J.A.; HART, R.J.; FRY, J.C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, Londres, v. 8, n.4, p. 170-177, 1986.

**CAPÍTULO 3: HAMBÚRGUER DE FRANGO COM ADIÇÃO DO HIDROLISADO
PROTEICO: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E
SENSORIAL**

RESUMO

Os hidrolisados proteicos podem ser adicionados em uma ampla variedade de alimentos, conferindo suplementação nutricional, melhoria nas propriedades funcionais do produto e aumento da digestibilidade devido à disponibilidade dos aminoácidos essenciais. Nos frigoríficos de frango são gerados muitos coprodutos, por exemplo, penas, ossos, sangue e vísceras, e, geralmente, são destinadas para ração animal, contudo, com baixo valor agregado. Os resíduos de carne aderidos aos ossos obtidos da desossa de frango possuem um alto teor de proteína que podem ser utilizados como substrato para hidrólise enzimática. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi suplementar uma formulação de hambúrguer de frango com hidrolisado proteico, obtido a partir de hidrólise enzimática de coproduto da desossa de frango. Foram elaboradas duas formulações, hambúrguer controle (sem adição de hidrolisado proteico) e hambúrguer com hidrolisado (com adição de 8% de hidrolisado proteico). Os hambúrgueres de frango foram avaliados em termos de análises físico-químicas, análises microbiológicas e análise sensorial. Os resultados obtidos para a análise microbiológica e análises físico-químicas do hambúrguer controle e do hambúrguer com hidrolisado, estão de acordo com os respectivos padrões estabelecidos pela legislação vigente. O hambúrguer com hidrolisado apresentou 6% mais proteína do que o hambúrguer controle, conferindo uma suplementação proteica ao produto desenvolvido. Em relação à análise sensorial para o atributo sabor, os avaliadores preferiram o hambúrguer com hidrolisado proteico. O hambúrguer com hidrolisado proteico e o hambúrguer controle obtiveram 84,2% e 81,8% de aceitação geral, respectivamente. A intenção de compra para o hambúrguer com adição de hidrolisado proteico foi de 76,4% e para o hambúrguer controle foi de 67%. Dessa maneira, foi possível concluir que o hidrolisado proteico obtido a partir de coproduto da desossa de frango é uma excelente alternativa para realizar a suplementação em alimentos.

Palavras-chave: Coproduto; Hambúrguer de frango; Desenvolvimento de produtos.

ABSTRACT

The protein hydrolysates may be added in a wide variety of foods, providing nutritional supplementation, to improve the functional properties of the product and increase the digestibility because of the availability of essential amino acids. In chicken slaughterhouses are generated many co-products, for example, feathers, bones, blood and guts, and generally are intended for animal feed, however, with low added value. The bones obtained from chicken debones have a high protein content that can be used as substrate for enzymatic hydrolysis. In this sense, the aim was to supplement a chicken burger formulation with protein hydrolyzate, obtained from enzymatic hydrolysis of co-product of chicken bones. Were prepared two formulations, burger control (without addition of protein hydrolyzate) and burger with hydrolyzed (with addition of 8% of protein hydrolyzate). The chicken burgers were evaluated in terms of physical-chemical, microbiological and sensory analysis. The results obtained for microbiological analysis and physical-chemical analysis of the burger control and burger with hydrolyzed, are in accordance with the respective standards set by law. The burger with hydrolyzate showed 1.02% more protein than the burger control, giving a protein supplementation to the product developed. In the sensorial analysis for flavor attribute evaluators preferred the burger with protein hydrolyzate. The burger with protein hydrolyzate and the burger control achieved 84.2% and 81.8% of general acceptance, respectively. The intention to buy for the burger with added protein hydrolyzate was 76.4% and for the burger control was 67%. Thus, it was concluded that the protein hydrolyzate obtained from chicken bones of the co-product is an excellent alternative to perform supplementation in food.

Keywords: co-product; Chicken burger; Product development.

3.1 INTRODUÇÃO

Os hidrolisados proteicos servem como suplemento nutricional, sendo adicionados em biscoitos e produtos tipo hambúrguer, *nuggets*, entre outros. Também podem ser utilizados em dietas para pessoas com problemas de digestão ou de má-absorção de proteínas, graças à sua elevada digestibilidade e disponibilidade dos aminoácidos essenciais (SGARBIERI, 1996).

De acordo com Furlan; Oetterer (2002) os hidrolisados proteicos de carne são utilizados tanto para modificar propriedades funcionais de alimentos, quanto como fonte de pequenos peptídeos e aminoácidos. As preparações ricas em pequenos peptídeos, especialmente di- e tripeptídeos, provenientes da hidrólise parcial de proteínas, possuem maior valor nutricional e uma absorção gastrointestinal mais eficiente quando comparados à proteína intacta e aminoácidos livres (BHASKAR et al. 2007).

Neste contexto, o trabalho apresenta a suplementação de hambúrguer de frango com hidrolisado proteico, obtido a partir de hidrólise enzimática de coproduto da desossa de frango. Os hambúrgueres foram avaliados em termos de análises físico-químicas, análises microbiológicas e análise sensorial.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material

As sobrecoxas sem osso e sem pele de frango, utilizadas para a elaboração de hambúrguer, foram adquiridas em uma distribuidora de carnes localizada em Chapecó-SC, armazenadas em câmara de congelamento à -18°C. O hidrolisado proteico de frango foi elaborado conforme descrito no Capítulo 2.

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Formulação do hambúrguer

Foram elaboradas duas formulações de hambúrguer de frango, a amostra controle (sem adição de hidrolisado proteico) e a amostra teste com adição de 8% de hidrolisado proteico, Tabela 3.1. A quantidade de sobrecoxa de frango e os demais ingredientes do hambúrguer foram mantidos nas mesmas concentrações para as duas formulações.

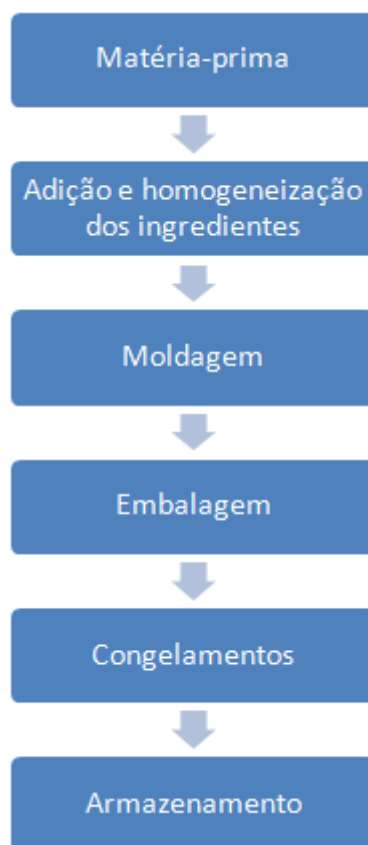
Tabela 3.1: Formulações dos hambúrgueres de frango

Ingredientes	Amostra controle (%)	Amostra com hidrolisado proteico (%)
Sobrecoxa de frango	82,5	82,5
Água/gelo	8,0	-
Hidrolisado proteico	-	8,0
Proteína texturizada de soja	2,0	2,0
NaCl	1,5	1,5
Eritorbato de sódio	0,2	0,2
Glutamato monossódico	1,7	1,7
Fosfato de sódio	0,5	0,5
Alho em pó	0,2	0,2
Cebola em pó	3,3	3,3
Pimenta branca	0,1	0,1

3.2.2.2 Fluxograma de elaboração do hambúrguer de frango

No fluxograma a seguir podem ser visualizadas as etapas de elaboração do hambúrguer de frango, Figura 3.1.

Figura 3.1: Fluxograma de elaboração do hambúrguer de frango



As sobrecoxas de frango sem osso e sem pele foram previamente descongeladas em câmara de resfriamento à 7°C por 24 horas e cortadas em cubos com auxílio de facas, Figura 3.2a. Em seguida a carne foi moída em moedor (Marca Tormafрил), equipado com disco de 6 mm de diâmetro, Figura 3.2b. Para as duas formulações foram realizadas as pesagens dos ingredientes conforme as concentrações descritas anteriormente, Figura 3.2c. A proteína texturizada de soja foi hidratada por 30 minutos, para a amostra controle a hidratação foi realizada com 8% de água e para a amostra teste a hidratação foi realizada com 8% de hidrolisado

proteico de frango, Figura 3.2d. Os ingredientes foram misturados por 5 minutos em misturador. Na sequência, os hambúrgueres foram modelados no formato característico, com peso individual de 50 g, Figura 3.3. Finalizando, os hambúrgueres foram embalados e congelados em câmara de congelamento à -18°C, até o momento de realização das análises.

Figura 3.2: Etapas da elaboração dos hambúrgueres de frango



a) Sobrecoxa de frango em cubos.



b) Sobrecoxa de frango moída.



c) Ingredientes pesados.



d) Proteína texturizada de soja hidratada.

Figura 3.3: Hambúrgueres de frango moldados



3.2.2.3 Análise microbiológica

As análises realizadas para as amostras foram: Coliformes à 45°C/g, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, *Clostridium* sulfito redutor à 46°C/g e *Salmonella* sp/25 g, de acordo com a RDC nº 12 da ANVISA que trata sobre o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos (BRASIL, 2001). Para a realização das análises microbiológicas, foram utilizados os métodos analíticos oficiais, de acordo com a Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2003).

3.2.2.4 Análises físico - químicas

As análises realizadas para o hambúrguer de frango com adição de hidrolisado proteico e para a amostra controle foram umidade pelo método de gravimétrico à 105°C, cinzas pelo método de incineração em mufla à 550°C, proteínas pelo método de Kjeldahl (fator de conversão 6,5), lipídios pelo método de Soxhlet e carboidratos por diferença (AOAC, 1995). Dessa forma, foi possível avaliar se as formulações elaboradas estavam de acordo com a Instrução Normativa nº 20, de 31 de Julho de 2000 do Ministério da Agricultura que trata sobre os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de hambúrguer (BRASIL, 2000).

3.2.2.5 Análise sensorial

Participaram da avaliação sensorial 110 avaliadores, entre alunos, professores e demais colaboradores da instituição, com idade de 18 a 40 anos, sendo 51% do gênero masculino e 49% do gênero feminino.

Os testes sensoriais realizados para o hambúrguer de frango com hidrolisado proteico e para o hambúrguer controle foram: o teste de preferência por meio da escala hedônica de 9 pontos (1- desgostei muitíssimo e 9 - gostei muitíssimo) e o teste de intenção de compra com uma escala de 5 pontos (1- certamente eu não compraria e 5 certamente eu compraria), de acordo com a metodologia descrita por Dutcosky (2013). A ficha utilizada na avaliação sensorial está no Anexo 2.

Os hambúrgueres foram preparados em chapa untada com óleo de soja e previamente aquecida. Os hambúrgueres foram aquecidos nos dois lados até que o atingissem a temperatura interna de 72°C no centro da peça, que é a temperatura de pasteurização para produtos cárneos, em torno de 10 minutos, aproximadamente 5 minutos de cada lado.

As amostras de 25 g foram servidas em pratos descartáveis e codificadas com números de 3 dígitos aleatórios. Foi solicitado aos julgadores que provassem as amostras da esquerda para direita. Foram disponibilizados copos descartáveis com água e torradas para os avaliadores consumirem entre uma amostra e outra.

O trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa número do CAAE 07802512.1.0000.0105, e os avaliadores assinaram um termo de consentimento, Anexo 3.

3.2.2.6 Análise estatística

Para os resultados das análises físico-químicas e sensoriais foram calculadas a média, desvio padrão e o teste de diferença de médias de duas amostras por meio do *t-Student* utilizando o programa computacional Action 2.7 da Microsoft Excel® (Microsoft Co.)

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Análises físico – químicas

Os resultados obtidos para a composição centesimal do hambúrguer controle e do hambúrguer com hidrolisado proteico estão de acordo com o padrão estabelecido pela legislação vigente (Tabela 3.2). O hambúrguer com hidrolisado apresentou 6% mais proteína do que o hambúrguer controle.

Tabela 3.2: Resultados da composição centesimal para os hambúrgueres

Análise	Hambúrguer controle (%) média $\pm$ d.p*	Hambúrguer com hidrolisado (%) média $\pm$ d.p*	Padrão** (%)
Proteína	16,95 ^a $\pm$ 0,07	17,97 ^b $\pm$ 0,13	15 (mínimo)
Lipídeos	5,52 ^a $\pm$ 0,47	4,83 ^a $\pm$ 0,29	23 (máximo)
Umidade	71,53 ^a $\pm$ 0,54	72,11 ^a $\pm$ 1,07	-
Cinzas	3,52 ^a $\pm$ 0,60	3,51 ^a $\pm$ 0,30	-
Carboidratos	2,48 ^a $\pm$ 0,46	1,58 ^a $\pm$ 0,38	3 (máximo)

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste *t-Student* ($P \leq 0,05$).

*d.p = desvio padrão.

**Segundo a Instrução Normativa nº 20, de 31 de Julho de 2000. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de almôndega, de apresuntado, de fiambre, de hambúrguer, de kibe, de presunto cozido e de presunto. Ministério da Agricultura, (BRASIL, 2000).

3.3.2 Análise microbiológica

Os resultados obtidos para a análise microbiológica do hambúrguer controle e do hambúrguer com hidrolisado estão de acordo com o padrão estabelecido pela legislação vigente, Tabela 3.3. Portanto, os hambúrgueres estão aptos para a comercialização e consumo.

Tabela 3.3: Resultados da análise microbiológica do hambúrguer controle e hambúrguer com hidrolisado proteico

Análise	Hambúrguer controle	Hambúrguer com hidrolisado	Padrão*
Coliformes a 45°C/g	$1,4 \times 10^2$	$6,2 \times 10^2$	5×10^3 UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positiva	1×10^2	1×10^2	5×10^3 UFC/g
<i>Clostridium</i> sulfito redutor a 46°C/g	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	3×10^3 UFC/g
Salmonella sp/25g	Ausência	Ausência	Ausência em 25 g

*Segundo a Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos, (BRASIL, 2002).

3.3.3 Análise sensorial

3.3.3.1 Teste de preferência

O teste de preferência do hambúrguer com hidrolisado proteico e do hambúrguer controle foi realizado pela escala hedônica de 9 pontos, no qual foram avaliados os atributos sabor, textura e impressão global. Os resultados podem ser observados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Médias de notas obtidas no teste de preferência para hambúrguer controle e com hidrolisado

Amostra	Sabor	Textura	Impressão Global
Hambúrguer controle	$7,51^a \pm 1,30$	$7,13^a \pm 1,41$	$7,28^a \pm 1,26$
Hambúrguer com hidrolisado	$7,78^a \pm 0,95$	$6,99^a \pm 1,44$	$7,38^a \pm 1,05$
p-valor	0,08	0,48	0,52

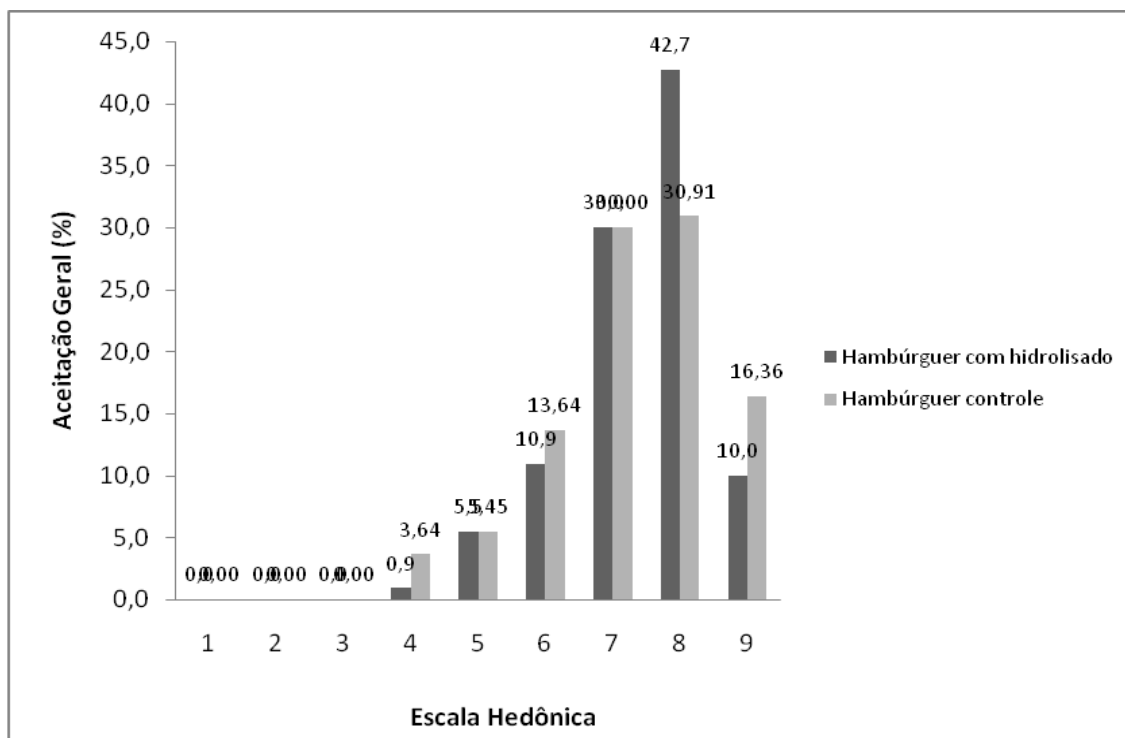
Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste *t-Student* ($p \leq 0,05$). 1 – Desgostei muitíssimo. 2 – Desgostei muito. 3 – Desgostei moderadamente. 4 – Desgostei ligeiramente. 5 – Não gostei/nem desgostei. 6 – Gostei ligeiramente. 7 – Gostei moderadamente. 8 – Gostei muito. 9 – Gostei muitíssimo.

Para todos os atributos sabor ($p = 0,08$), textura ($p = 0,48$) e impressão global ($p = 0,52$) não houve diferença significativa ao nível de 5% de confiança para as duas amostras avaliadas. Dessa forma, pode ser um indicativo que os avaliadores não perceberam gosto amargo no hambúrguer com hidrolisado proteico.

Esse resultado está de acordo com o fabricante da enzima Protamex®, que afirma que ao comparar essa enzima com várias outras endoproteases, a Protamex® produz hidrolisados protéicos não amargos, (NOVOZYMES, 2013). Liaset *et al.* (2002) estudaram a recuperação de nitrogênio na hidrólise enzimática dos subprodutos de salmão (*Salmo salar*, L.) com a protease Protamex®. De acordo com os autores essa protease foi selecionada para o estudo por produzir um hidrolisado sem sabor amargo. Porém, os autores não realizaram análise sensorial do hidrolisado obtido para avaliar a presença ou ausência de gosto amargo.

O hambúrguer com hidrolisado proteico e o hambúrguer controle obtiveram 84,2% e 81,8% de aceitação geral, respectivamente. De acordo Dutcosky (2013) o índice de aceitação deve ser maior que 75%, portanto, as duas formulações foram aceitas pelos consumidores. Porém, a aceitação do hambúrguer com hidrolisado proteico foi maior. Dessa forma, o hidrolisado proteico obtido a partir de coproduto da dessoragem de frango é uma excelente alternativa para realizar a suplementação em alimentos.

Figura 3.4: Frequência de respostas para aceitação geral para hambúrguer controle e com hidrolisado

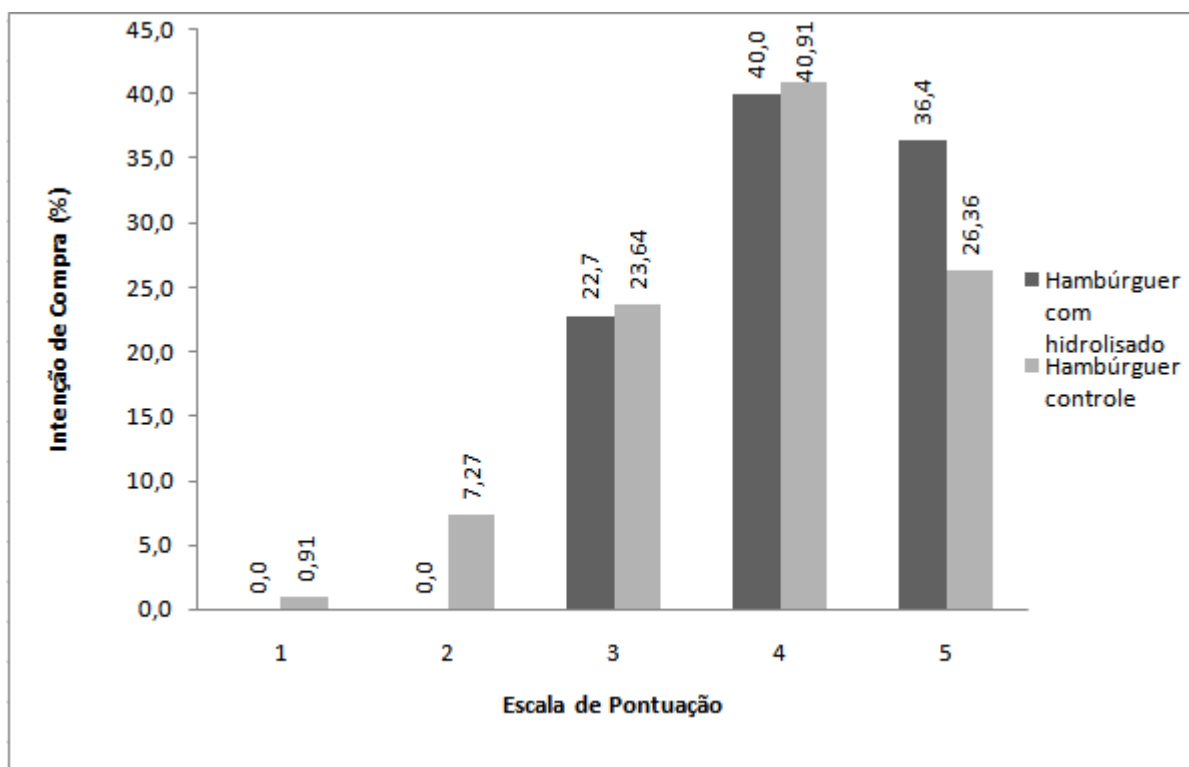


1 – Desgostei muitíssimo. 2 – Desgostei muito. 3 – Desgostei moderadamente. 4 – Desgostei ligeiramente. 5 – Não gostei/nem desgostei. 6 – Gostei ligeiramente. 7 – Gostei moderadamente. 8 – Gostei muito. 9 – Gostei muitíssimo.

3.3.3.2 Intenção de compra

A intenção de compra para o hambúrguer com hidrolisado proteico e hambúrguer controle foi realizada por uma escala de 5 pontos, Figura 3.5. A intenção de compra para o hambúrguer com adição de hidrolisado proteico foi de 76,4% e para o hambúrguer controle foi de 67%.

Figura 3.5: Frequência de respostas para intenção de compra de hambúrguer controle e com hidrolisado



1 – Certamente eu não compraria. 2 – Provavelmente eu não compraria. 3 – Talvez eu compraria/Talvez eu não compraria. 4 – Provavelmente eu compraria. 5 – Certamente eu compraria.

3.4 CONCLUSÃO

- ✓ Os resultados obtidos para a análise microbiológica e análise físico-química do hambúrguer controle e do hambúrguer com hidrolisado, estão de acordo com os respectivos padrões estabelecidos pela legislação vigente. O hambúrguer com hidrolisado apresentou 1,02% mais proteína do que o hambúrguer controle.
- ✓ Para todos os atributos sabor, textura e impressão global não houve diferença significativa ao nível de 5% de confiança para as duas amostras avaliadas. O hambúrguer com hidrolisado proteico e o hambúrguer controle obtiveram 84,2% e 81,8% de aceitação geral. A intenção de compra para o hambúrguer com hidrolisado proteico foi de 76,4% e para o hambúrguer controle foi de 67%.
- ✓ Diante do exposto, foi possível concluir que o hidrolisado proteico obtido a partir de coproduto da desossa de frango é uma alternativa para suplementar alimentos.

REFERÊNCIAS

AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official analytical chemist. Editor: Horwitz W. 13th Ed. Washington, DC. 1995.

BRASIL, Instrução Normativa nº 20, de 31 de Julho de 2000. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Almôndega, de Apresuntado, de Fiambre, de Hambúrguer, de Kibe, de Presunto Cozido e de Presunto**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, v. 1, n. 1 – 2, p. 3, 31 de jul. 2000.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 20 dez. 2000.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Métodos Analíticos Oficiais Microbiológicos para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Diário Oficial da União – DOU 18 de setembro de 2003.

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

DUTCOSKY, Silvia Deboni. **Análise sensorial de alimentos**. 4. ed. rev. ampl. Curitiba: Champagnat, 2013. 531 p.

FURLAN, E.F.; OETTERER, M. Hidrolizado proteico de pescado. **Revista de Ciência e Tecnologia**, Piracicaba, v. 10, n. 19, p. 79-89, 2002.

KOBLITZ, MARIA GABRIELA BELLO. **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2013. 242 p.

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. 2009, 188 f. **Estudos dos processos de hidrólise enzimática e secagem por atomização para obtenção de hidrolisado proteico de frango em pó**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

LIASET, B.; NORTVEDT, R.; LIED, E.; ESPE, M. Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex™ protease. **Process Biochemistry**, Bergen, v. 37, p. 1263–1269, 2002.

Novozymes. **Ficha técnica Protamex®**. Bagsvaerd Denmark, 2013.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos proteicos: Propriedades – degradações – modificações**. São Paulo: Varela, 1996.

CONCLUSÃO GERAL

- ✓ Foi possível otimizar o processo de hidrólise enzimática do coproduto da desossa de frango e verificar que o hidrolisado é uma alternativa para suplementar alimentos, agregar valor ao coproduto e aumentar a competitividade dos frigoríficos.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Estudar as propriedades funcionais do hidrolisado proteico.
- ✓ Aplicar o hidrolisado em concentrações variadas em diferentes alimentos.
- ✓ Avaliar o grau de hidrólise com a utilização de outras enzimas proteolíticas no coproduto da desossa de frango e calcular os custos de produção.
- ✓ Realizar uma avaliação sensorial do gosto do hidrolisado proteico com diferentes graus de hidrólise para avaliar a presença de residual amargo com uma equipe de avaliadores treinados ou com a língua eletrônica.

ANEXOS

Anexo 1: Procedimentos analíticos para aminoácidos totais e triptofano

Anexo 2: Ficha de avaliação sensorial

Anexo 3: Comprovante do comitê de ética e termo de consentimento