

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**UTILIZAÇÃO DE CARNE MECANICAMENTE SEPARADA DE FRANGO
PARA PRODUÇÃO DE UM HIDROLISADO PROTÉICO A PARTIR DE
ENZIMAS MICROBIANAS**

Daniele Misturini Rossi

(Engenheira de Alimentos – UFSC)

Dissertação de Mestrado apresentada como um dos requisitos a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre (RS), Brasil

Março, 2007.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub pela orientação prestada e generosidade dispensados durante o tempo de convívio.

A Prof.^a Dr^a Simone Hickmann Flôres pelo apoio, paciência e dedicação ao longo de toda sua co-orientação.

A bolsista Débora Justin Chaves e a amiga Janaína Guimarães Venzke por todo o apoio, dedicação e empenho oferecidos durante o curso do mestrado.

Aos colegas do BiotecLab pelo auxílio e amizade prestados ao longo do desenvolvimento do projeto e aos funcionários e professores do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), que de alguma forma colaboraram com a pesquisa.

A empresa Avipal pelo fornecimento da matéria-prima utilizada durante o decorrer do trabalho e a empresa Solae Company pela disponibilidade de utilização do equipamento de secagem.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Aos meus pais e familiares pelo apoio e incentivo e em especial ao meu marido, Rodrigo Rossi, por toda a dedicação, paciência, amor e compreensão.

UTILIZAÇÃO DE CARNE MECANICAMENTE SEPARADA DE FRANGO PARA PRODUÇÃO DE UM HIDROLISADO PROTÉICO A PARTIR DE ENZIMAS MICROBIANAS

Autor: Daniele Misturini Rossi

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub

Co-orientador: Simone Hickmann Flôres

Resumo

A carne mecanicamente separada de frango (CMSF), material oriundo do processamento de carcaças na indústria avícola, foi empregada como fonte protéica para a produção do hidrolisado utilizando enzimas proteolíticas. As condições de hidrólise foram otimizadas usando metodologia de superfície de resposta (MSR). A influência das variáveis temperatura (T), pH e concentração de enzima (E) foram avaliadas em função do Índice de Hidrólise (IH). As condições ótimas encontradas para a enzima Alcalase e Flavourzyme foram T de 50 °C, pH de 7,5 e (E) de 2,5 % e T de 50 °C, pH de 6,0 e (E) de 3,5%, respectivamente. Alcalase obteve uma recuperação protéica de 89 % e a Flavourzyme obteve 66,5 %. Alcalase foi utilizada para a produção do hidrolisado, posteriormente seco em spray-drier, o qual obteve um conteúdo de proteína total de 57,90 %. O hidrolisado apresentou boa qualidade microbiológica e o perfil molecular indicou a presença de pequenas proteínas e peptídeos na faixa de 12 000 a 5807 Da. A avaliação biológica mostrou elevada digestibilidade e NPR para a proteína hidrolisada quando comparada com a caseína, contrastando com os baixos valores encontrados para metionina e cistina na análise de aminoácidos.

^{1/} Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente – Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (106 pg). Março, 2007.

UTILIZATION OF MECHANICALLY DEBONED CHICKEN MEAT FOR THE PRODUCTION OF PROTEIN HYDROLYSATE USING MICROBIAL PROTEASES

Author: Daniele Misturini Rossi

Advisor: Marco Antônio Záchia Ayub, PhD

Co-Advisor: Simone Hickmann Flôres

Abstract

Mechanically deboned chicken meat (MDCM), obtained from surplus carcasses in the poultry process industry, was used as a source to the production of protein hydrolysates using proteolytic enzymes. Hydrolysis conditions were optimized using the response surface methodology (RSM). The influence of the process variables temperature (T °C), pH and enzyme concentration, (E) was studied with regard to the hydrolysis index (HI). The optimum values for Alcalase and Flavourzyme were T of 50 °C, pH of 7.5 and (E) of 2.5 % and T of 50 °C, pH of 6.0 and (E) of 3.5 %, respectively. Alcalase recovered 89 % of protein and Flavourzyme 66.5 %. The Alcalase was used to produce the spray-dried hydrolysate and obtained 57.90 % of total protein. The spray-dried hydrolysate presented good microbiological quality and molecular weight ranging from 5,807 to 12,000 Da. The biological evaluation showed high digestibility and NPR to protein hydrolysate when compared with casein, contrasted with the low values of methionine and cystine found in amino acid analysis.

^{1/} Master of Science Dissertation in Agricultural Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (106 p.). March, 2007.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Enzimas proteolíticas.....	3
2.2 Importância das proteínas nos alimentos	4
2.3 Importância da proteína hidrolisada.....	7
2.4 Propriedades funcionais e físico-químicas das proteínas hidrolisadas	10
2.4.1 Solubilidade	11
2.4.2 Osmolaridade	12
2.5 Carne mecanicamente separada de frango (CMSF)	13
2.5.1 Qualidade microbiológica	14
2.6 Formas de hidrólise protéica.....	16
2.6.1 Hidrólise ácida	16
2.6.2 Hidrólise alcalina.....	17
2.6.3 Hidrólise enzimática.....	17
2.7 Enzimas comerciais.....	19
2.7.1 Alcalase	19
2.7.2 Flavourzyme	20
2.8 Formação do sabor amargo.....	20
2.9 Secagem	22
2.10 Avaliação da qualidade nutricional de proteínas.....	22
2.11 Planejamento experimental e otimização de processos	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Instalações e reagentes utilizados.....	27
3.2 Produção de protease por <i>Bacillus</i>	27
3.3 Determinação da atividade proteolítica.....	29
3.4 Otimização do processo de hidrólise	30
3.5 Preparação da matéria-prima para análise.....	32
3.6 Hidrólise enzimática.....	33
3.7 Análise de proteína solúvel.....	34
3.8 Determinação do índice de hidrólise.....	35
3.9 Produção do hidrolisado protéico em pó	35
3.10 Análises microbiológicas	37
3.10.1 Contagem total de microrganismos	38
3.10.2 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais.....	38
3.10.3 Investigação de <i>Salmonella sp.</i>	39
3.11 Análises físico-químicas	40
3.11.1 Umidade	40
3.11.2 Proteína	41
3.11.3 Gordura	41
3.11.4 Carboidratos	41
3.11.5 Cinzas.....	41
3.11.6 Fibras.....	41

3.11.7	Aminoácidos	41
3.12	Avaliação nutricional do hidrolisado protéico	42
3.12.1	Digestibilidade	43
3.12.2	Quociente de eficiência líquida de proteína (NPR)	44
3.12.3	Eficiência de alimento, utilização de alimento, utilização de proteína.	44
3.12.4	Índices de digestibilidade protéica corrigida pelos escores de aminoácidos (PDCAAS)	44
3.13	Gel filtração.....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1	Produção de protease por <i>Bacillus</i>	47
4.2	Planejamento experimental da hidrólise enzimática	50
4.3	Eficiência de recuperação protéica	60
4.4	Avaliação da contaminação microbiológica	64
4.5	Avaliação bromatológica da matéria-prima e do hidrolisado em pó....	68
4.6	Gel filtração.....	71
4.7	Qualidade nutricional do hidrolisado	73
5	CONCLUSÕES.....	81
6	PERSPECTIVAS	82
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
APÊNDICE 1.....		93
APÊNDICE 2.....		94
APÊNDICE 3.....		95
APÊNDICE 3: Continuação.....		96
APÊNDICE 4.....		97
APÊNDICE 4: Continuação.....		98
APÊNDICE 5.....		99
APÊNDICE 5: Continuação.....		100
APÊNDICE 5: Continuação.....		101
APÊNDICE 5: Continuação.....		102
APÊNDICE 6.....		103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Fluxograma da produção do hidrolisado protéico.....	34
Figura 2:	Dispositivos do Spray-drier	37
Figura 3:	Atividade enzimática de culturas de <i>Bacillus circulans</i> BL 53 e <i>Bacillus</i> BL 13 em meio contendo amido.....	48
Figura 4:	Atividade enzimática de culturas de <i>Bacillus circulans</i> BL 53 e <i>Bacillus</i> BL 13 em meio contendo glicose	48
Figura 5:	Superfície de resposta e contorno para a obtenção do índice de hidrólise (IH) utilizando a enzima Alcalase: Interação entre pH x T(°C)	53
Figura 6:	Superfície de resposta e contorno para a obtenção do índice de hidrólise (IH) utilizando a enzima Alcalase: Interação entre T (°C) x (E)	54
Figura 7:	Superfície de resposta e contorno para a obtenção do índice de hidrólise (IH) utilizando a enzima Alcalase: Interação entre (E) x pH.....	55
Figura 8:	Superfície de resposta e contorno para a obtenção do índice de hidrólise (IH) utilizando a enzima Flavourzyme: Interação entre pH x T (°C)	56
Figura 9:	Superfície de resposta e contorno para a obtenção do índice de hidrólise (IH) utilizando a enzima Flavourzyme: Interação entre T(°C) x (E)	57
Figura 10:	Superfície de resposta e contorno para a obtenção do índice de hidrólise (IH) utilizando a enzima Flavourzyme: Interação entre (E) x pH	58
Figura 11:	Curvas de proteína solúvel (g/L) a temperatura de 50 °C, concentração de enzima de 2,5 % e pH 7,5 para Alcalase e pH 6,0 para Flavourzyme	61
Figura 12:	Gel filtração do hidrolisado em Sephadex G100	72
Figura 13:	Gel filtração do hidrolisado em Sephadex G 25	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Recomendações em aminoácidos essenciais para crianças, pré-escolares e adultos	6
Tabela 2:	Dietas que utilizam hidrolisados protéicos na nutrição humana	9
Tabela 3:	Composição do meio de cultivo para produção de protease	28
Tabela 4:	Enzimas comerciais utilizadas nos ensaios de hidrólise da Carne mecanicamente separada de frango	30
Tabela 5:	Variáveis independentes e codificadas utilizadas no planejamento experimental para a hidrólise enzimática de CMSF	32
Tabela 6:	Composição das dietas experimentais utilizadas durante ensaio biológico	43
Tabela 7:	Planejamento Experimental para a hidrólise enzimática de CMSF ...	51
Tabela 8:	Resultado das análises microbiológicas dos diferentes lotes de CMS recebidos	64
Tabela 9:	Contagem microbiana em vários estágios na produção do hidrolisado	66
Tabela 10:	Resultados das análises bromatológicas realizadas nos lotes de CMS recebidos	69
Tabela 11:	Composição química da carne mecanicamente separada de frango (CMSF) e do hidrolisado protéico em pó	70
Tabela 12:	Parâmetros calculados em ensaio biológico	74
Tabela 13:	Composição de aminoácidos essenciais e valores de PDCAAS para a proteína hidrolisada	76
Tabela 14:	Aminoácidos não essenciais da proteína hidrolisada	79

1 INTRODUÇÃO

A utilização de hidrolisados protéicos, provenientes de origem animal e vegetal, em formulações específicas é uma área de crescente interesse. Os usos destes hidrolisados incluem aplicações clínicas, tais como produtos geriátricos, suplementos energéticos, dietas para controle de peso e terapêuticas ou dietas entéricas. A maior parte dos hidrolisados utilizados, atualmente, são obtidos da caseína e da proteína de soja.

A partir dos anos 70, dietas contendo hidrolisados pancreáticos de caseína e ovoalbumina começaram a ser comercializados. Atualmente, existem vários produtos que utilizam como fonte protéica, de forma exclusiva ou parcial, hidrolisado de proteínas. Porém, o custo de fabricação destes hidrolisados ainda é muito alto e a maior parte é importada, fazendo com que poucas pessoas tenham acesso a este tipo de tratamento. Por isso, o desenvolvimento de hidrolisados obtidos a partir de fontes protéicas de baixo valor agregado podem ser uma boa alternativa para minimizar os custos de produção deste tipo de produto.

A avicultura brasileira vem ao longo dos anos obtendo resultados favoráveis, com uma produção em 2005 de 9.348,2 mil toneladas de carne de frango, com consumo “per capita” de 35,76 kg, cerca de 8,5 % superior a 2004, fazendo do Brasil o maior produtor e exportador de carne de aves.

A carne mecanicamente separada (CMSF) é obtida em grandes quantidades na indústria avícola, resultante do corte, desossa e limpeza

manual das carcaças. A estrutura óssea final, que ainda apresenta algum resíduo muscular não aproveitado na retirada dos cortes nobres, é o material passível de sofrer separação por meios mecânicos. A CMSF é freqüentemente utilizada em embutidos processados como preenchimento e contribui para a diminuição no custo do produto final.

Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo desenvolver um hidrolisado protéico em pó, a partir da hidrólise enzimática de carne de frango mecanicamente separada, um subproduto da indústria avícola e com quantidade apreciável de proteína, o qual pode ser uma fonte econômica para a produção destes hidrolisados . Análises físico-químicas e microbiológicas, gel filtração, análise de aminoácidos e ensaio biológico foram realizados a fim de caracterizar o hidrolisado. Estes dados permitirão saber em que tipo de dieta este produto poderá ser utilizado, já que as fórmulas hidrolisadas utilizadas em pacientes precisam ter características distintas para determinado tipo de doença.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas proteolíticas

Enzimas proteolíticas representam um importante grupo de enzimas industriais. Elas têm uma ampla faixa de aplicações biotecnológicas como a produção de alimentos, detergentes, couro, hidrolisados protéicos e fármacos (Al-shehri et al., 2004). Estas enzimas são classificadas em endoproteases ou endopeptidases, os quais hidrolisam ligações peptídicas interiores a cadeia polipeptídica em ligações particularmente suscetíveis distribuídas ao longo da cadeia, enquanto as exoproteases removem aminoácidos N ou C terminais também pela hidrólise de ligações peptídicas (Clemente, 2000).

As proteases extraídas de reservas vegetais mais conhecidas são a papaína, bromelina e algumas queratinases. Estas possuem maior atividade em faixas de pH entre 5 e 9 e são ativas em temperaturas acima de 70 °C. As proteases mais conhecidas de fontes animais são a tripsina pancreática, a quimiotripsina, a pepsina e as reninas utilizadas tanto para composição de meios de cultivo como para produção de queijos. Podem variar bastante sua faixa de pH ótimo e sua temperatura compreende a faixa de 30 a 50 °C. A tripsina tem pouca aplicação na indústria de alimentos, pois sua ação gera proteínas hidrolisadas com elevado amargor (Rao et al., 1998).

As proteases bacterianas são as mais importantes, comparadas com as de animais e fungos. A maioria das proteases comerciais, principalmente as neutras e alcalinas, são produzidas pelo gênero *Bacillus*. Elas são divididas em

dois grupos: o das neutro-alcalinas e o das alcalinas. No primeiro grupo a faixa ótima de pH está inserida entre 5 e 8 e, geralmente, possuem baixa termotolerância. Neste grupo estão as neutrases, as metaloproteases e as serino-proteases que se diferenciam pelos agentes inibidores, aplicações industriais e pelos ativadores enzimáticos. No segundo grupo estão compreendidas as proteases ativas em pH 10 ou maior, caracterizadas pelo amplo espectro de afinidade por substratos. Sua temperatura ótima está em torno de 60 °C e estas propriedades conferem a estas proteases boas perspectivas para uso em indústrias de detergentes (Rao et al., 1998).

Os mesmos autores comentam que as proteases fúngicas possuem grande diversidade e exibem grande espectro de afinidade por substratos, tal como as bactérias. Possuem ampla faixa de pH, variando de 4 a 11. Entretanto, possuem menor taxa de reação que as bacterianas e são mais termolábeis. Entre as proteases fúngicas, as de maior interesse são as produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus sp.*

2.2 Importância das proteínas nos alimentos

De acordo com Giese (1994), as proteínas são componentes alimentares nutricionalmente e funcionalmente essenciais. As proteínas são adicionadas aos alimentos como fonte de energia e aminoácidos ou como ingrediente capaz de conferir ou modificar a aparência, a textura, o aroma e o sabor.

As proteínas estão amplamente distribuídas na natureza, porém poucos alimentos contêm proteínas com todos os aminoácidos essenciais, como as de origem animal usadas como referência (ovo e leite). Os alimentos

de origem animal, como carnes, peixes, aves, leite, queijo e ovos, possuem proteínas de boa qualidade, suficientes para torná-los melhores fontes de aminoácidos essenciais. Entre os vegetais, as leguminosas são as mais ricas em proteína, contendo de 10 a 30 %, porém são deficientes em metionina e cistina. Os cereais possuem menor conteúdo protéico, em torno de 6 % a 15 % e são deficientes em lisina (Oliveira & Marchini, 1998).

De acordo com Bobbio e Bobbio (1995), algumas proteínas de origem vegetal, além de apresentarem deficiência em um ou mais aminoácidos essenciais, podem também apresentar problemas nutricionais por estarem acompanhadas de substâncias tóxicas ou de inibidores de enzimas proteolíticas. Algumas plantas, por exemplo o feijão e soja crus, possuem componentes que inibem a tripsina intestinal e estimulam a secreção de mais proteína pelo pâncreas, produzindo assim, alterações metabólicas que resultam em redução de crescimento (Oliveira & Marchini, 1998).

As proteínas simples são compostas por cerca de 20 aminoácidos dos quais nove são considerados essenciais. Neste caso, a síntese efetuada pelo organismo não é suficiente para suprir as necessidades metabólicas e precisam ser fornecidos como uma parte da dieta. São classificados como aminoácidos essenciais: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina (Oliveira & Marchini, 1998; Mahan, 2002).

Os requerimentos de aminoácidos essenciais são mais elevados para recém nascidos, diminuindo consideravelmente em crianças acima de 12 anos e adultos. Isto reflete a importância das proteínas para o crescimento, que

é bastante intenso na infância (Sgarbieri, 1996; Fennema, 2000). A Tabela 1 mostra as estimativas das necessidades de aminoácidos para crianças e adultos.

Tabela 1: Recomendações em aminoácidos essenciais para crianças, pré-escolares e adultos.

<i>Aminoácidos</i>	<i>Bebês (3-4 meses)</i>	<i>Crianças (2 anos)</i>	<i>Crianças (10-12 anos)</i>	<i>Adultos</i>
	mg/kg/dia	mg/kg/dia	mg/kg/dia	mg/kg/dia
Histidina	28	-	-	8-12
Isoleucina	70	31	28	10
Leucina	161	73	44	14
Lisina	103	64	44	12
Metionina e cistina	58	27	22	13
Fenilalanina e tirosina	125	69	22	14
Treonina	87	37	28	7
Triptofano	17	12.5	3.3	3.5
Valina	93	38	25	10
Total (exceto para histidina)	714	352	216	84

Fonte: Adaptado de FAO/WHO/UNU (1985).

A ausência ou a ingestão inadequada de qualquer um destes aminoácidos essenciais leva a balanço negativo de nitrogênio, perda de peso, crescimento prejudicado em bebês e crianças e sintomas clínicos. As necessidades de proteínas e de cada aminoácido essencial reduzem-se progressivamente com o aumentar da idade a partir da infância, o que permite

o uso de dietas com menor proporção de aminoácidos essenciais em relação aos não essenciais para adultos saudáveis (Waitzberg, 2001).

Os aminoácidos não essenciais, alanina, ácido aspártico, aspargina, ácido glutâmico, glutamina, são igualmente importantes para a estrutura da proteína, entretanto, se quantidades adequadas de certos aminoácidos não essenciais não estiverem presentes na hora da síntese de proteína, podem ser sintetizados a partir de aminoácidos essenciais ou de precursores de carbono e nitrogênio apropriados, prontamente sintetizados nas células (Mahan, 2002).

2.3 Importância da proteína hidrolisada

Proteínas hidrolisadas possuem um grande número de propriedades funcionais, que as tornam uma fonte atrativa para uso em nutrição humana, tanto para fins médicos como para produtos de uso geral (Frokjaer, 1994).

De acordo com Lahl e Braun (1994), os critérios mais importantes para a seleção de proteínas em hidrolisados são o valor nutricional, custo, sabor e alergenicidade. As proteínas mais comumente utilizadas em produtos nutricionais são caseína, proteínas do leite e proteínas de soja.

Hidrolisados protéicos são produzidos com diferentes propósitos, ou seja, para aumentar as propriedades funcionais ou produção de pequenos peptídeos e aminoácidos, os quais são usados em muitos produtos como agentes flavorizantes. Na forma desidratada, estes hidrolisados são também utilizados devido a sua fácil digestibilidade, alta solubilidade em água, alto conteúdo protéico e longa vida de prateleira, quando na forma seca (Stanley, 1981; Pedersen, 1994).

Quanto à eficiência metabólica na utilização dos hidrolisados parciais, comparados com os aminoácidos livres e proteína intacta, vários estudos têm demonstrado que indivíduos normais absorvem igualmente aminoácidos livres, hidrolisados parciais e a proteína intacta da dieta, enquanto indivíduos com problemas digestivos e de absorção utilizam melhor os peptídeos (hidrolisados) quando comparados com as dietas de aminoácidos livres. O problema relativo às dietas contendo apenas aminoácidos livres é a elevada osmolaridade que age no sentido de dificultar a absorção dos aminoácidos; já as proteínas intactas são mal digeridas pelos indivíduos com síndromes de mal absorção e/ou problemas de digestão (Sgarbieri, 1996).

Os hidrolisados de proteínas usados em formulações nutricionais são classificados em duas grandes categorias: proteínas hidrolisadas parcialmente ou extensivamente. As parcialmente hidrolisadas possuem certa proporção de proteínas que são ou intactas ou ligeiramente degradadas, com peptídeos entre 8000 e 20 000 Da e pequena fração de aminoácidos. Proteínas extensivamente hidrolisadas são compostas, principalmente, por aminoácidos livres e peptídeos muito pequenos (Mahmoud, 1994; Maldonado et al., 1998). A Tabela 2 mostra os principais usos dos hidrolisados protéicos na nutrição humana.

De acordo com Cordle (1994), alimentos baseados em proteínas hidrolisadas são úteis no controle de alergias alimentares. A alergia alimentar, mais freqüente em crianças e mais grave em adultos, é um problema de saúde com sintomas variando desde erupções cutâneas até processos anafiláticos sérios que ameaçam a sobrevivência do indivíduo. Proteínas extensivamente

hidrolisadas têm reduzido substancialmente a reatividade imunológica e são principalmente usadas em fórmulas infantis hipoalergênicas. Estas fórmulas são compostas, principalmente, por aminoácidos livres e peptídeos muito pequenos. Peptídeos com peso molecular acima de 5000 Dalton não são encontrados em hidrolisados protéicos hipoalergênicos (Mahmoud, 1994)

Tabela 2: Dietas que utilizam hidrolisados protéicos na nutrição humana.

<i>Suplementação protéica</i>	<i>Uso clínico</i>
Bebidas energéticas	Fenilcetonúria
Produtos Geriátricos	Fórmulas infantis hipoalergênicas
Nutrição Esportiva	Doenças crônicas e agudas
Dietas para controle de peso	Síndrome do intestino curto
	Doença de Crohn
	Pancreatites
	Colites ulcerativas

Fonte: Adaptado de Clemente, 2000.

Fórmulas baseadas nas proteínas hidrolisadas e aminoácidos têm encontrado uso clínico também nas dietas enterais. Estas fórmulas são ministradas às pessoas incapazes de ingerir adequada quantidade de alimento na forma convencional. Schmidl et al. (1994), citam que as fórmulas hidrolisadas são úteis na rápida recuperação pós-cirúrgica e no tratamento de pacientes que apresentam doenças ou condições clínicas e fisiológicas que prejudicam o funcionamento do sistema digestório, tais como: colite ulcerativa, fibrose cística, síndrome do intestino curto, fístulas, pancreatites, traumas severos e doença de Crohn. O conteúdo de proteína ministrado nas fórmulas varia de 19 a 84 g/L. Na alimentação enteral dá-se preferência a fórmulas

poliméricas simples compostas por proteínas e peptídeos, devido à excelente absorção gastrintestinal e baixa osmolaridade, sendo melhor utilizadas pelo organismo do que as proteínas intactas ou os aminoácidos (Oliveira & Marchini, 1998).

2.4 Propriedades funcionais e físico-químicas das proteínas hidrolisadas

Propriedades funcionais têm sido definidas como qualquer propriedade de um alimento ou componente de um alimento, incluindo as nutricionais, que influencie a sua aceitação e utilização (Sgarbieri, 1996).

As propriedades funcionais referem-se ao comportamento físico ou performance de proteínas em alimentos e refletem interações que são influenciadas pela composição de proteínas; sua estrutura e/ou conformação; associações intermoleculares de proteínas e outros ingredientes de alimentos (água, carboidratos, lipídios) e pela natureza do ambiente no qual estes são medidos (Kinsella, 1977).

A avaliação das propriedades funcionais é necessária, pois ajuda a indústria de alimentos a selecionar a proteína certa para uma dada aplicação ou para definir qual proteína ou derivado pode ser substituída em determinadas formulações alimentícias (Quaglia & Orban, 1990). Esta avaliação é estendida também a alimentos hidrolisados utilizados em formulações especiais, pois estas propriedades afetam o processamento, a estabilidade de armazenamento, qualidade organoléptica e a eficácia biológica e nutricional do produto (Mahmoud, 1994).

2.4.1 Solubilidade

Uma das mais importantes propriedades físico-químicas e funcionais dos hidrolisados é a sua solubilidade sob uma ampla faixa de pH, temperatura, concentração de nitrogênio e condições iônicas (Mahmoud, 1994).

A solubilidade de uma proteína depende do peso molecular e conformação das moléculas, densidade e distribuição de cargas, temperatura e concentração de íons. De modo geral, a solubilidade é influenciada pela maior ou menor afinidade das moléculas de proteínas pelo seu solvente (Sgarbieri, 1996).

Proteínas altamente solúveis podem ser necessárias em aplicações nas quais emulsificação e formação de biofilme são importantes; enquanto a baixa solubilidade pode ser desejável em aplicações com altos níveis de proteína e quando limitada emulsificação ou interações proteína-proteína são necessárias (Giese, 1994).

A solubilidade dos aminoácidos em água é altamente variável. Adição de ácidos ou bases aumenta a solubilização através da formação de sais. Prolina, hidroxiprolina, glicina e alanina são extremamente solúveis, já cisteína e tirosina são menos solúveis em água. Com isso, a extensão da solubilidade de aminoácidos em proteínas hidrolisadas é diferente das observadas para componentes individuais (Belitz, 2004).

2.4.2 Osmolaridade

A osmolaridade é definida como o acréscimo de partículas osmoticamente ativas, em milimoles, dissolvidos em um quilograma de solvente. A osmolaridade é uma importante característica físico-química de fórmulas nutricionais infantis e adultos (Waitzberg, 2001).

Soluções de alta osmolaridade, isso é, produtos hipertônicos ou hiperosmolares podem atrair grandes quantidades de água para dentro do intestino, causando diarreias severas, possibilidade de desidratação e descontrole do balanço eletrolítico, bem como podem induzir náuseas e distensão abdominal (Mahmoud, 1994).

As fórmulas para uso geral têm osmolaridade entre 300 e 500 mOsm/kg, que é semelhante a osmolaridade dos fluidos corpóreos. A osmolaridade das fórmulas com alta densidade de nutrientes é maior, de 400 a 700 mOsm/kg. Já as fórmulas hidrolisadas podem ter até 900 mOsm/kg de água (Mahan, 2002).

As dietas elementares ou monoméricas (compostas apenas por aminoácidos livres), que possuem elevada osmolaridade, são indicadas nas deficiências graves digestivo-absortivas, porém, sempre que possível, terão preferência dietas com moléculas mais complexas, como as oligoméricas (parcialmente hidrolisadas) e as hiperprotéicas (Oliveira & Marchini, 1998),

2.5 Carne mecanicamente separada de frango (CMSF)

Muitos fatores contribuíram para o crescimento do consumo da carne de aves nos últimos anos. A diminuição do custo de produção e a modernização da tecnologia, fizeram com que produtos diferenciados que utilizam a carne mecanicamente separada de aves como matéria-prima fossem introduzidos no mercado atual (Móri et al., 2006).

Segundo Brasil (2000), entende-se por Carne Mecanicamente Separada (CMS) a carne retirada a partir de ossos, carcaças ou partes de carcaças, com exceção dos ossos da cabeça, submetidos à separação mecânica em equipamentos especiais - Máquinas de Separação Mecânica (MSM), e imediatamente congelada, por processos rápidos ou ultra - rápidos, quando não for utilizada no momento seguinte.

O alto teor de nutrientes, a elevada atividade de água e o pH próximo à neutralidade podem favorecer o desenvolvimento de microrganismos contaminantes, originários da própria ave ou de fontes externas. Então, devido à sua composição, estrutura física e pH elevado, a carne mecanicamente separada é um produto altamente perecível. Sua vida útil é limitada pelo desenvolvimento microbiano e oxidação de lipídeos (Hoffmann et al., 2002).

A carne mecanicamente separada pode ser adicionada aos derivados de carne em níveis que variam de 20 a 60 %, o que possibilita redução de custo. Quando no processamento da CMS, são respeitadas as boas práticas fabricação, esta não apresenta riscos à saúde humana. (Móri et al., 2006).

2.5.1 Qualidade microbiológica

A qualidade microbiológica da carne de frango é fundamental para a saúde pública, pois esta carne deve apresentar carga bacteriana baixa e ausência de *Salmonella sp.*, microrganismo patogênico para o homem e animais e que pode ser transmitido por alimentos (Branco et al., 2002).

A qualidade microbiológica inicial da carne mecanicamente separada está diretamente relacionada com as condições de higiene do processamento e do grau de contaminação dos ossos processados. A limpeza e desinfecção dos equipamentos e instalações da separação mecânica devem ser efetuadas em intervalo suficiente para garantir a higiene em cada turno da operação, segundo as boas práticas de manufatura (Brasil, 2000).

A análise de *Salmonella sp.*, coliformes fecais, coliformes totais e mesófilos em carcaça é usada no controle da qualidade dos produtos derivados do frango. Estes microrganismos em alimentos processados evidenciam contaminação pós-sanitização ou práticas de higiene aquém dos padrões indicados (Cardoso et al., 2000).

O método de contagem de microorganismos em placas é um método geral, que pode ser utilizado tanto para contagem de grandes grupos microbianos, como os aeróbios mesófilos, os aeróbios psicrófilos, os bolores e leveduras, como também para a contagem dos gêneros *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*.

O grupo de coliformes totais inclui as bactérias na forma de bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48

horas a 35 °C. O grupo inclui cerca de 20 espécies, os quais encontram-se bactérias originárias do trato gastrointestinal como também diversos gêneros e espécies de bactérias não entéricas. Sua presença em alimentos é considerada uma indicação útil de contaminação pós-sanitização ou pós-processo, evidenciando práticas de higiene e sanificação aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimentos (Silva et al., 1997).

A definição para o grupo de coliformes fecais é a mesma de coliformes totais, porém, restringindo-se aos membros capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 h a 44,5 – 45,5 °C. A presença de coliformes fecais em alimentos informa sobre as condições higiênico sanitárias. A atual legislação, refere-se a coliformes fecais como termotolerantes (ANVISA, 2001).

De acordo com a ANVISA (2001), para carnes de aves resfriadas “in natura” ou congeladas a presença de bactérias do gênero *Salmonella sp*, implica em produto impróprio para consumo ou potencialmente capaz de causar toxinfecção alimentar. No que diz respeito a “coliformes” a 45 °C ou “coliformes termotolerantes”, o limite de tolerância para a amostra indicativa é de 10^4 e a tolerância para amostra representativa é de $m= 5 \times 10^3$ e $M= 10^4$.

Técnicas padronizadas para a cultura de microrganismos são utilizadas para monitorar o conteúdo microbiano de hidrolisados protéicos. A indústria deve fornecer um produto livre de microrganismos deletérios. Quando o produto for utilizado em fórmulas parenterais, estes devem estar livres de endotoxinas (Lahl & Braun, 1994).

2.6 Formas de hidrólise protéica

As fórmulas hidrolisadas comercialmente disponíveis no mercado usam o tratamento térmico, hidrólises ácidas, alcalinas ou enzimáticas, ou a combinação de dois ou mais destes métodos (Kinsella, 1977; Adler-Nissen, 1977; Lahl & Braun, 1994).

A aplicação de tratamentos térmicos produz basicamente proteínas de alto peso molecular desnaturadas, mas não hidrolisadas. O uso de ácidos e álcalis requer neutralização posterior à hidrólise, o que conduz a altas quantidades de sais em solução, ocasionando baixa qualidade nutricional dos produtos (Clemente, 2000).

2.6.1 Hidrólise ácida

Os hidrolisados protéicos mais comumente preparados por hidrólise ácida são soja, glúten, caseína e leveduras. Estes hidrolisados têm distintivas características de flavour, os quais são remanescentes de carnes e são usados em pacotes e enlatados para acentuar o sabor cárneo (Kinsella, 1977).

Na hidrólise ácida ocorre à decomposição do triptofano e pode ocorrer a degradação parcial da serina, treonina e cisteína, hidrólise de ligações de amida nos aminoácidos aspargina e glutamina. A digestão com ácidos fortes em condições extremas de processamento conduzem a hidrolisados com baixa qualidade funcional e nutricional (Webster et al., 1982).

2.6.2 Hidrólise alcalina

A hidrólise alcalina é utilizada há muito tempo em diversos processos industriais, como na obtenção da gelatina, eliminação de películas externas dos produtos hortícolas no preparo para enlatamento, inativação de constituintes tóxicos dos alimentos e desnaturação das proteínas nos processos de fiação e texturização entre outros (Sgarbieri, 1996).

A hidrólise alcalina pode causar a racemização como consequência da reação de β -eliminação, com perdas totais ou parciais de diversos aminoácidos como a cisteína, serina, treonina e lisina; hidrólise de amidas e degradação de arginina; formar ligações químicas permanentes e substâncias tóxicas como lisino-alanina, tornando a proteína indisponível ao metabolismo do organismo (Sgarbieri, 1996; Oliveira & Marchini, 1998).

2.6.3 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática tem sido usada para a modificação das propriedades funcionais e nutricionais de proteínas alimentares. Estas modificações são desejáveis quando se quer aumentar a incorporação de proteínas em formulações específicas. Este tipo de hidrólise tem mostrado aumento na solubilidade, nas propriedades emulsificantes e liberação de peptídeos biologicamente ativos de certas proteínas (Spellman et al., 2003).

A hidrólise enzimática é desenvolvida sob condições brandas de temperatura (40-60 °C) e pH (6-8), evitando extremos que são utilizados, geralmente para tratamentos químicos e físicos. Proteínas hidrolisadas enzimaticamente contendo peptídeos de cadeia curta, composições de

aminoácidos característico e tamanho molecular definido, são altamente desejáveis para formulações específicas (Clemente, 2000).

A partir de refugos bovinos tais como fígado, rúmen e tecidos parcialmente desengordurados, Webster et al. (1982) prepararam hidrolisados protéicos com quatro enzimas diferentes na concentração de 2 % em temperatura de 50 °C. O pH foi mantido constante durante o curso da enzimólise. A recuperação de proteína solúvel ficou entre 45 até 85 % em quatro horas de hidrólise. A papaína em pH 5,5 mostrou-se a mais efetiva de todas as enzimas e a neutrase em pH 7,0 a menos efetiva. Todas as enzimas menos a Alcalase em pH 8,5 foram eficientes na hidrólise do colágeno. Este na forma não desnaturada mostrou-se resistente ao ataque enzimático.

Surówka e Fik (1992) hidrolisaram cabeças de frango jovens moídas com uma protease de *Bacillus subtilis*, usando 0,2 % de enzima e adição de 75 % de água. A temperatura e pH ótimos foram 55 °C e pH 7,0. A recuperação protéica alcançou 39,6 % e o hidrolisado em pó alcançou 78,1 % de proteína total. Os mesmos autores, Surówka e Fik (1994), utilizando agora Pepsina na concentração de 2,1 %, pH 1,5 e temperatura de 55 °C durante 5 horas, obtiveram um hidrolisado com alta qualidade microbiológica, sem amargor e alto conteúdo mineral.

Fonkwe & Singh (1996), utilizando resíduos de carne mecanicamente separada de peru, obtiveram recuperação protéica de 46 %, usando proteína bruta (1,7 unidade/mg sólidos). O hidrolisado continha 78 % de proteína e 5,7 % de gordura. A fração nitrogenada consistia principalmente de aminoácidos e pequenos peptídeos com massa molecular menor que 6500

Da, devido ao alto grau de hidrólise. O produto final apresentou baixa viscosidade e capacidade emulsionante e boas quantidades de cálcio, fósforo, potássio e magnésio.

Nilsang et al. (2005) utilizaram um concentrado solúvel de peixe para produzir um hidrolisado protéico, utilizando as enzimas industriais Kojizime e Flavourzyme. As condições de hidrólise foram otimizadas usando a metodologia de superfície de resposta. As variáveis estudadas foram temperatura, tempo e concentração de enzima. As condições de otimização encontradas para Flavourzyme foram 50 LAPU/g proteína (LAPU: Unidades de Leucina Aminopeptidase), 20 % (peso/peso), 45 °C e 6 horas. Para a enzima Kojizime as condições foram: 40 LAPU/g proteína, 20 % (peso/peso), 50 °C e 6 horas. Kojizime aumentou a liberação de alguns aminoácidos amargos, tais como o triptofano durante o processo de hidrólise, já com a enzima Flavourzyme não ocorreu à liberação de aminoácidos amargos, por isso foi escolhida para produção do hidrolisado em pó, o qual consistia de 66 % de proteína.

2.7 Enzimas comerciais

2.7.1 Alcalase

Alcalase 2.4 L FG é uma protease bacteriana produzida por fermentação submersa através de uma cepa de *Bacillus liqueniformis*. O principal componente enzimático, Subtilisin A (Subtilisin Calsberg EC 3.4.21.14), é uma endoproteínase profusamente descrita na literatura. Sua atividade declarada é de 2,4 AU/g (Unidades de Anson por grama), medida de

acordo com o método DMC (Método Dimetil caseína). As condições ótimas de desempenho da Alcalase são temperaturas entre 55 e 70 °C, dependendo do tipo de substrato e pH entre 6,5 e 8,5.

2.7.2 Flavourzyme

Flavourzyme é um complexo enzimático com atividade endopeptidases e exopeptidase associadas. É produzido por fermentação de um selecionado tipo de *Aspergillus oryzae* e seu pH ótimo está na faixa de 5,0 a 7,0. A temperatura ótima está em torno de 50 °C. Flavourzyme pode ser usada para remoção do amargor de hidrolisados protéicos a baixos graus de hidrólise. Sua atividade declarada é de 500 LAPU/g (Unidade Leucina Aminopeptidase). Um LAPU/g é o acréscimo de enzima que hidrolisa 1 mmol de L-leucina-p-nitroanilida por minuto de acordo com o método analítico da Novo Nordisk (1996).

2.8 Formação do sabor amargo

O tratamento enzimático de várias proteínas de alimentos resulta num sabor amargo devido à formação de peptídeos de baixo peso molecular, compostos principalmente de aminoácidos hidrofóbicos. É importante salientar que os peptídeos que causam amargor são produtos naturais da clivagem de ligações peptídicas nas proteínas (Adler-Nissen, 1977; Saha & Hayashi, 2001).

Segundo Ney apud FitzGerald & O'Cuinn (2006), a medida do amargor está relacionada com a hidrofobicidade média do peptídeo. A hidrofobicidade do peptídeo (Q) foi calculada através da energia livre de transferência das cadeias de aminoácidos do etanol para a água. Peptídeos

com valores de hidrofobicidade (Q) maiores que 1400 calorias por mol e massa molecular menores que 6000 Da exibem amargor. Já, peptídeos com valores de Q menores que 1300 calorias por mol e massa molecular maior que 6000 Da podem não ser amargos. Peptídeos menores que 6000 Da tendo um alto conteúdo de leucina, prolina, fenilalanina, tirosina, isoleucina e triptofano são, provavelmente, amargos.

A adição de polifosfatos e peptídeos com altos teores de ácido glutâmico têm sido utilizados para mascarar o sabor amargo dos hidrolisados protéicos. A adição de gelatina também pode resultar em efeito similar. Tem-se sugerido também que altas concentrações de glicina, um aminoácido com leve sabor, pode ser utilizado para mascarar o sabor amargo (Stanley, 1981; Kilara, 1985).

O amargor de peptídeos isolados é geralmente avaliado sensorialmente usando um grupo de pessoas que são treinadas em um painel sensorial. Isto é feito por comparação do hidrolisado protéico com uma solução padrão amarga como soluções de sulfato de quinino (Saha & Hayashi, 2001).

Os tratamentos com separação seletiva, tratamento com carvão ativo, filtros de fibra de vidro e aplicação de exopeptidases são técnicas de remoção de peptídeos amargos que também retiram a cor dos hidrolisados. O uso de exopeptidases reduz o amargor, porém conduz a um produto final altamente hidrolisado, consistindo de aminoácidos livres e pequenos peptídeos, com isso, tendo uma alta osmolaridade o qual pode limitar o uso destes produtos (Kilara, 1985; Pedersen, 1994).

A remoção do amargor dos hidrolisados por reações de transpeptidação, como a “reação da plasteína”, também representa outra forma potencial de remover o amargor (Saha & Hayashi, 2001; Fitzgerald & O’Cuinn, 2006).

2.9 Secagem

A desidratação ou secagem é um método importante de conservação de alimentos. A redução do volume, do peso e a maior estabilidade dos produtos desidratados reduz, consideravelmente, os custos de transporte, distribuição e estocagem.

A secagem por spray-drier é um dos vários métodos de conversão do produto líquido em pó, que tem sido vantajoso pelo fácil manuseio e aumento da estabilidade (Hamid et al., 2002). Atualmente, uma grande variedade de alimentos é seca por atomização, desde produtos lácteos como leites, iogurtes, queijo e soro de queijo, até manteiga, açúcares, adoçantes e proteínas diversas.

Na secagem por atomização, é importante controlar a temperatura do spray-drier para prevenir a caramelização de carboidratos residuais ou a formação de reações de Maillard. Quando operados de maneira adequada, estes equipamentos não atingem temperaturas de pasteurização e não ocasionam qualquer depreciação do produto final (Lahl & Braun, 1994).

2.10 Avaliação da qualidade nutricional de proteínas

Os organismos animal e humano necessitam de quantidades determinadas dos diferentes nutrientes essenciais ou indispensáveis. Portanto,

a primeira estimativa do valor nutritivo de um alimento ou de uma dieta deve ser feita com base no conhecimento da composição química, portanto da proporção e das quantidades em que os diferentes nutrientes estão presentes (Sgarbieri, 1987).

A qualidade nutricional de uma proteína está relacionada a sua capacidade de satisfazer as necessidades do ser humano, de promover crescimento normal em crianças e manutenção dos adultos (Oliveira & Marchini, 1998)

A qualidade da proteína pode ser avaliada por métodos químicos, biológicos e microbiológicos. O escore químico compara a composição de aminoácidos de uma proteína ou dieta com a de uma proteína de referência, geralmente a albumina do ovo, considerada de alta qualidade por proporcionar crescimento máximo num animal em desenvolvimento (Waitzberg, 2001).

Os métodos biológicos baseiam-se no ganho de peso e na retenção de nitrogênio em ensaios com animais experimentais, alimentados com dietas que contenham a proteína em estudo (Fennema, 2000). A vantagem dos métodos biológicos é que se está determinando, em última análise, a biodisponibilidade dos nutrientes diretamente para a espécie usada no teste de alimentação (Sgarbieri, 1987).

Quanto mais baixo o escore químico ou o valor biológico de uma proteína, maior a quantidade desta proteína é necessária para equilibrar o balanço nitrogenado. Experimentalmente existem evidências de que algumas dietas enterais a base de soja sejam inferiores à da caseína em qualidade protéica, necessitando da complementação de aminoácidos limitantes,

notadamente cisteína, triptofano e treonina. Uma alternativa para corrigir um baixo valor biológico é a adição de metionina em dietas enterais a base de proteína de soja, principalmente para recém-nascidos (Waitzberg, 2001).

A qualidade da proteína pode ser medida também por métodos como a taxa de eficiência protéica (PER- Net Protein Ratio), que mede a habilidade de uma proteína para promover o crescimento em ratos. Este método, subestima o valor de proteínas de plantas, especialmente aquelas deficientes em aminoácidos sulfurados, visto que animais usados em ensaios possuem requerimentos maiores (~50%) para estes aminoácidos quando comparados aos humanos (Castro et al., 2000).

Um método alternativo a PER é a taxa de proteína líquida (NPR), o qual estima a proteína usada ambas para o crescimento e para a manutenção, pela inclusão de um grupo experimental recebendo dieta livre de proteína (Sgarbieri, 1996).

Os métodos microbiológicos determinam a qualidade das proteínas com base na disponibilidade de seus aminoácidos essenciais. O microrganismo é cultivado em um meio contendo, como única fonte de nitrogênio, a proteína teste ou uma proteína de referência, normalmente a caseína. A comparação do crescimento nos dois meios, expressa em porcentagem, permite avaliar a qualidade da proteína. Os principais microrganismos utilizados são *Tetrahymena pyriformis* e *Streptococcus zymogenes* (Hernández et al., 1996).

2.11 Planejamento experimental e otimização de processos

O planejamento experimental é baseado em princípios estatísticos onde os pesquisadores podem extrair do sistema em estudo o máximo de informações úteis, fazendo um número mínimo de experimentos. Os métodos utilizados são ferramentas poderosas com os quais vários objetivos específicos podem ser alcançados. Podem-se fabricar produtos com melhores características, diminuir o tempo de seu desenvolvimento, aumentar a produtividade de processos, minimizar a sensibilidade de produtos as variações de condições ambientais e assim por diante (Neto et al., 2001).

A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfície de resposta, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativas e erro (Rodrigues & Lemma, 2005). A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma importante ferramenta no processo e na obtenção de um produto. É uma coleção de dados experimentais e técnicas de otimização que permitem ao experimentador determinar a relação entre a resposta e as variáveis independentes (Eren & Kaymak-Ertekin, 2007).

Atualmente, a MRS tem sido amplamente aplicada para diferentes propósitos em processos químicos e bioquímicos. Alguns exemplos de aplicações da MRS utilizadas para realização de processos bioquímicos são: hidrólises de substratos, síntese enzimática de ésteres graxos, produção de proteases alcalinas por *Bacillus mojavensis* em bioreator entre outros. RSM não é usada somente para otimização, mas também para determinação de

constantes cinéticas e investigação da estabilidade e cinética de enzimas (Bas & Boyaci, 2007).

Os métodos utilizados independem da natureza do problema a que são aplicados. Eles servem para estudar reações químicas, sistemas biológicos, processos mecânicos e também varrer todas as possíveis escalas de interesse, desde uma reação em bancada até um processo industrial operando em larga escala (Neto et al., 2001).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instalações e reagentes utilizados

Os experimentos de hidrólise, análises microbiológicas e demais ensaios foram realizados no laboratório de Biotecnologia. As análises bromatológicas foram realizadas no laboratório de Bromatologia, ambos localizados no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os reagentes químicos utilizados nos experimentos estavam disponíveis nos laboratórios.

3.2 Produção de protease por *Bacillus*

A primeira etapa do projeto de pesquisa teve como objetivo a produção de protease por duas cepas de *Bacillus*, pertencentes a bacterioteca do BIOTECLAB, ICTA/UFRGS, denominados BL 53 (*Bacillus circulans*) e BL 13 (*Bacillus sp.*). Os microorganismos foram isolados do meio aquático da região da Amazônia. Apenas a cepa BL 53 já havia sido identificada em trabalhos anteriores, através de métodos bioquímicos e morfológicos por dois laboratórios independentes ambos certificados (Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS e Fundação Tropical, Campinas, SP, Brasil).

O meio inicial usado para a produção da protease possuía como principal fonte de carbono o extrato solúvel de fibra de soja (obtida como resíduo industrial nas plantas de produção de proteína isolada de soja),

suplementado com a adição de NaNO_3 como fonte de nitrogênio e outros sais. Foram testados mais dois meios, tendo como fonte de carbono amido e glicose, respectivamente. A Tabela 3, mostra a composição dos meios de cultivo utilizado para a produção de protease.

Tabela 3: Composição do meio de cultivo para produção de protease.

<i>Meio com soja</i>	<i>(g/L)</i>	<i>Meio amido/glicose</i>	<i>(g/L)</i>
Extrato solúvel de soja	30	Amido/ glicose	20
NaNO_3	5	Peptona	5
K_2HPO_4	5	Extrato de levedura	5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
Na_2CO_3	5	K_2HPO_4	1,0
-	-	CaCl_2	0,02

Fonte: Adaptado de Al-shehri et al., 2004.

O extrato solúvel de soja foi obtido colocando-se uma quantidade de fibra de soja em copo de Becker de 1L. Neste conteúdo foi adicionado água destilada na proporção 1:6 e o material foi autoclavado. O conteúdo foi transferido para frascos Erlenmeyer de 500 mL e colocados em placa agitadora a 250 rpm por 30 min sob temperatura ambiente até a completa solubilização. A mistura foi centrifugada (Hitachi Himac CR 21 E-Japão) a 10.000g por 15 minutos a temperatura de 4 °C. O sobrenadante (extrato) foi recolhido, filtrado e posteriormente utilizado como fonte de carbono no meio de cultura para produção de protease.

A produção da enzima foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultivo, ajustado a pH 7,0. O inóculo foi

preparado com os meios citados anteriormente e inoculado com as cepas de *B. circulans* BL 53 e *Bacillus sp.* BL 13. Seguiu-se à padronização do inóculo e este foi adicionado ao meio , incubado em agitador orbital a 37 °C e 100 rpm por um período de 96 horas. Amostras foram coletadas em intervalos de tempos de 24 horas e submetidas à análise da atividade proteolítica.

3.3 Determinação da atividade proteolítica

Para analisar a atividade das enzimas comerciais e da enzima produzida por *Bacillus* em laboratório, foi realizado o ensaio com azocaseína, adaptado por Sarath et al. (1989). Esta técnica baseia-se na detecção de peptídeos coloridos de baixo peso molecular solubilizados mediante hidrólise, após precipitação por centrifugação de grandes fragmentos de azocaseína. Em tubos de microcentrífuga contendo 250µL de uma solução-substrato com 2% de azocaseína em tampão fosfato de sódio 0,05 M e pH 7,0, adicionou-se 150 µL de enzima em diferentes concentrações. A mistura foi incubada em banho-maria a 40 °C +/- 0,2 °C por 40 minutos e, no final deste período, adicionou-se ácido tricloroacético a 10 % em cada tubo. Para cada concentração enzimática preparou-se um branco, misturando, nesta ordem, enzima, TCA e substrato azocaseína. Após 15 minutos necessários para a completa precipitação dos fragmentos de azocaseína, centrifugaram-se os tubos a 14.000 rpm por 5 minutos. Transferiu-se 1 mL do sobrenadante para um tubo de ensaio contendo 1 mL de hidróxido de sódio 1,0 M. A absorbância foi lida a 440 nm em espectrofotômetro “Hitachi” modelo U-1100. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir, em cubetas de 1cm, a variação de uma unidade na absorbância sob as

condições do método. Este ensaio foi realizado em duplicata para todas as enzimas.

3.4 Otimização do processo de hidrólise

A otimização da hidrólise enzimática foi realizada usando planejamento central composto 2^3 com três pontos centrais e seis pontos axiais, totalizando 17 experimentos. As três variáveis estudadas foram temperatura (T °C), pH e concentração da enzima (E).

Neste trabalho foram utilizadas duas enzimas comerciais, Alcalase 2.4 L FG e Flavourzyme cedidas pela empresa Novozymes Latin América Ltda. Suas formulações comerciais encontram-se na Tabela 4. Os parâmetros utilizados para cada variável foram selecionados de acordo com os dados constantes na literatura científica. Ressalta-se que as enzimas não possuíam dados referentes ao tratamento enzimático em produtos cárneos.

Tabela 4: Enzimas comerciais utilizadas nos ensaios de hidrólise da carne mecanicamente separada de frango.

<i>Enzima</i>	<i>Formulação</i>	<i>Origem</i>	<i>Fabricante</i>
Alcalase 2.4 L FG	Líquida	bacteriana	Novozymes Latin América LTDA
Flavourzyme 500 L	Líquida	fúngica	Novozymes Latin América LTDA

O modelo experimental é representado por uma regressão polinomial de segunda ordem, onde \hat{y} denota o índice de hidrólise, como mostrado na Eq (1):

$$\hat{y} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 \quad (1)$$

Onde, \hat{y} é a resposta predita, x_1 , x_2 , e x_3 são as variáveis independentes, b_0 é um termo externo, b_1 , b_2 , e b_3 são efeitos lineares e b_{11} , b_{12} , b_{13} , b_{22} , b_{23} e b_{33} são as interações entre os efeitos.

Os fatores foram codificados de acordo com a Eq (2).

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad (2)$$

Na Eq (2), 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 espaçamento entre as variáveis. O software Statistica 5.0 (Statsoft, USA) foi usado para análises gráficas e de regressão dos dados. A análise estatística do modelo foi realizada pela análise de variância (ANOVA). A variância explicada pelo modelo é dada pelo coeficiente de determinação, R^2 . A Tabela 5 mostra os valores das variáveis reais e codificadas utilizadas no planejamento para as enzimas Alcalase e Flavourzyme.

Tabela 5: Variáveis reais e codificadas utilizadas no planejamento experimental para a hidrólise enzimática de CMSF.

Variáveis Reais	Símbolo	Variáveis Codificadas				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
T ^a	X ₁	30	38	50	62	70
pH	X ₂ [*]	5,5	6,3	7,5	8,7	9,5
pH	X ₂ ^{'**}	4,5	5,1	6,0	6,9	7,5
Concentração de enzima (%) ^a	X ₃	0,5	1,3	2,5	3,7	4,5

X₂^{*} - Variável real para a enzima Alcalase

X₂^{**} - Variável real para a enzima Flavourzyme

^a Valores utilizados para ambas as enzimas.

3.5 Preparação da matéria-prima para análise

A CMS foi recebida mensalmente durante o período de ensaio, congelada em lotes de 8 kg totalizando cinco lotes. De cada lote recebido foram retiradas, assepticamente, amostras para a realização das análises físico-químicas e microbiológicas.

Os lotes recebidos foram preparados para posterior hidrólise conforme segue: a CMS era previamente descongelada e pesada em béquer de 500 mL e este material foi suspenso em igual quantidade de água destilada. Esta suspensão de CMS em água foi processada em aparelho homogeneizador do tipo moinho de vibração coloidal "PUC-Vikostator" modelo JV-14, por aproximadamente cinco vezes, até ser obtida uma suspensão fina e homogênea. O material foi guardado em recipientes de 500 mL e congelado. As amostras foram descongeladas de acordo com os ensaios realizados.

3.6 Hidrólise enzimática

A amostra foi descongelada sob refrigeração e submetida a um tratamento térmico, a 85 °C por 15 minutos, em banho-maria, com a finalidade de desnaturar as proteínas facilitando o ataque enzimático. O pH foi ajustado com NaOH 1,0M ou HCl 1,0 M, de acordo com o planejamento experimental. Depois de ajustado o pH, a amostra retornava para o banho-maria a fim de atingir a temperatura de trabalho. Em seguida, o material foi distribuído em frascos Erlenmeyer de 250 mL e as enzimas foram adicionadas nas respectivas concentrações, de acordo com o planejamento, em função da atividade enzimática medida pelo método de Sarath et al. (1989).

Utilizou-se para os experimentos de hidrólise um banho-maria metabólico “Marconi” do tipo Dubnoff com agitação mecânica horizontal fixada em 200 rpm. Não houve ajuste do pH durante o curso da hidrólise. Retiraram-se amostras de aproximadamente 1mL no tempo zero e a cada 20 minutos totalizando 2 horas de hidrólise. As amostras eram retiradas e colocadas em tubos de microcentrífuga e imediatamente colocadas em banho-maria a $90 \pm 0,3$ °C por 10 minutos visando inativar a enzima. Após atingirem a temperatura ambiente, os tubos eram centrifugados por 10 minutos a 14 000 rpm em microcentrífuga “Eppendorf” modelo 5410 e submetidos à análise de proteína solúvel pelo método de Lowry et al. (1951). A Figura 1 mostra o fluxograma da produção do hidrolisado protéico em pó. As etapas de concentração e secagem foram realizadas após a otimização da hidrólise na produção do hidrolisado.

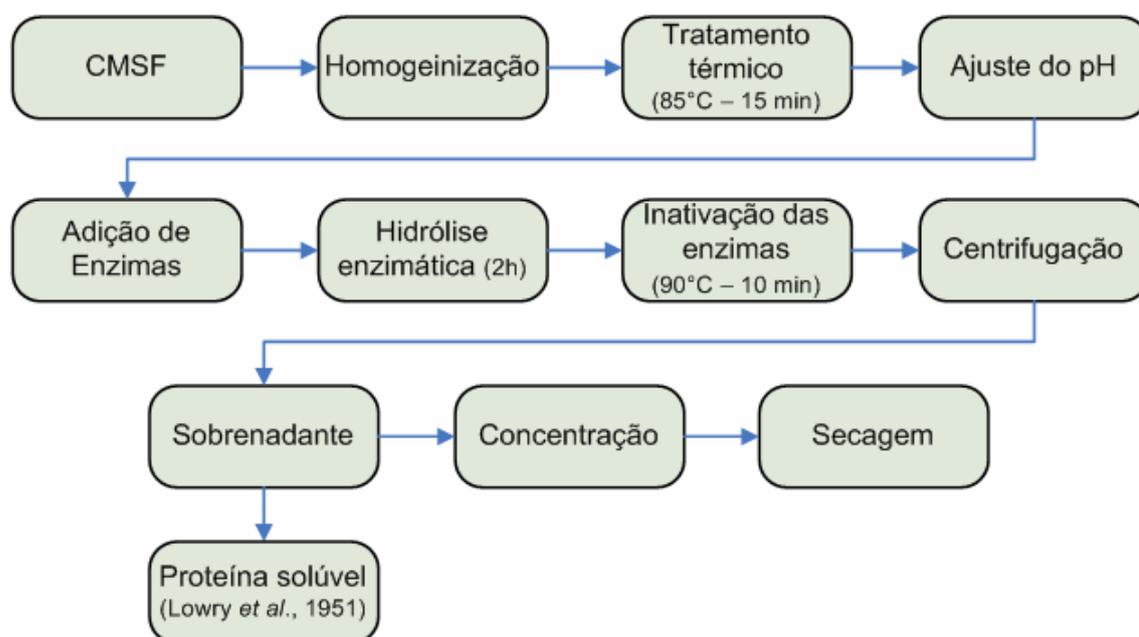


Figura 1: Fluxograma da produção do hidrolisado protéico.

3.7 Análise de proteína solúvel

Para determinar a quantidade de proteína solúvel contido nas amostras utilizou-se o método descrito por Lowry et al. (1951). O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente de Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II) e produz um composto com absorção máxima em 750 nm. Esta redução ocorre através das cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina), que contribuem com quatro elétrons, ou através da retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela formação do quelato entre o cobre (II) e peptídeos/proteínas (Zaia et al., 1998). A principal vantagem deste método é a sua alta sensibilidade e, por isso, tem sido utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais em diversos meios.

Feitas as diluições necessárias, as determinações de proteína solúvel de cada ponto foram realizadas em duplicata. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Ultrospec 3100, Amersham Bioscience) a 750 nm. Uma curva padrão foi preparada diariamente com soroalbumina bovina em concentrações na faixa de 0 a 0,5 mg/mL.

3.8 Determinação do índice de hidrólise

A determinação do índice de hidrólise foi obtida de acordo com a equação (3):

$$IH = \frac{P_{S2} - P_{S1}}{P_H} \quad (3)$$

Onde P_{S2} é o máximo valor de proteína solúvel P_{S1} é o valor inicial de proteína solúvel no sistema, antes da adição da enzima e P_H , é a quantidade de proteína total na carne mecanicamente separada de frango homogeneizada, determinada pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1990).

O máximo valor de proteína solúvel foi verificado pelas curvas de hidrólise e a eficiência de recuperação protéica foi obtida pela comparação deste valor com o valor de proteína no substrato (CMSF homogeneizada) segundo Soares et al. (2000).

3.9 Produção do hidrolisado protéico em pó

O hidrolisado protéico foi produzido em bioreator "Biostat" (B.Braun, Germany) com tanque encamisado com capacidade para 8 litros. A hidrólise foi realizada com a enzima Alcalase 2.4 L FG, o qual foi otimizada através do

planejamento experimental. As condições de hidrólise foram: T de 50 °C, pH 8,0 e concentração da enzima de 2,0 %, durante 2 horas. A amostra não passou por tratamento térmico anterior a hidrólise a 85 °C, como ocorreu no processo de otimização, pois o volume de amostra era muito grande, dificultando a uniformidade do tratamento. Um ensaio foi realizado em menor escala para medir a proteína solúvel em ambos os processos, com e sem tratamento. Os resultados mostraram que não houve grande diferença na solubilização protéica (Apêndice 1).

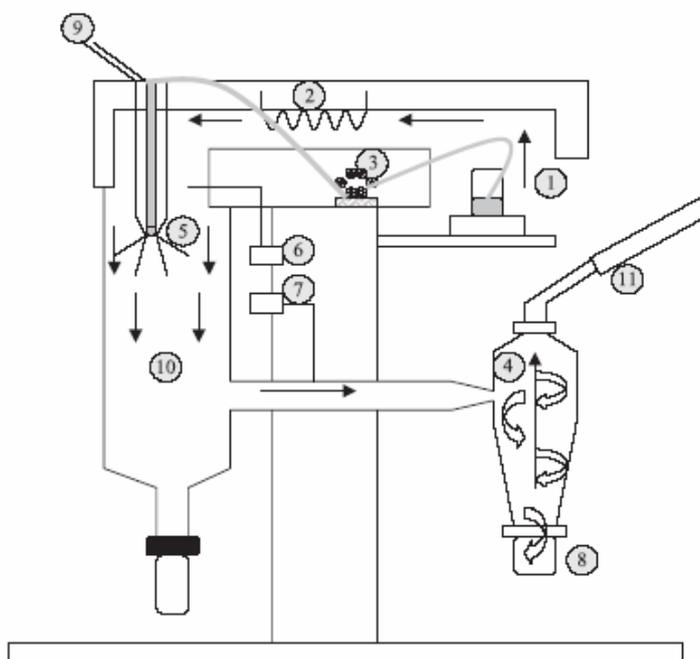
Após a hidrólise, a amostra foi submetida a um tratamento térmico, em autoclave a 90 °C por 20 minutos, a fim de inativar a enzima presente. O hidrolisado foi centrifugado por 10 minutos a 8000 g em centrífuga (Sorvall RC-5B, Du Pont Instruments, USA). A autoclave foi utilizada apenas para inativar a enzima utilizando somente o calor, sem pressão.

Determinou-se a quantidade total de sólidos (extrato seco) no hidrolisado bruto. O material foi submetido à concentração em rotavapor (Laborota Heidolph 400, Germany), até alcançar a quantidade de sólidos necessária para secagem.

O processo de secagem foi realizado em planta-piloto da empresa Solae Company, localizada em Esteio, RS. Para tal, utilizou-se spray-drier de bancada da marca Mini Spray Drier Buchi B 191 (Suíça). A Figura 2 ilustra o spray-drier utilizado no processo de secagem.

As condições de secagem otimizadas foram: Temperatura de entrada do ar de secagem: 160°C, temperatura de saída: 97-100 °C, volume de ar: 700 L.h⁻¹, vazão de produto: 160 mL.h⁻¹, bico atomizador: 1,0 mm. Ao

produto concentrado foi adicionado 5 % de maltodextrina, como veículo adjuvante de secagem e 1 % de carbonato de cálcio como antiuementante.



Fonte: Adaptado por Fernández-Pérez et al. (2004).

Figura 2: Dispositivos do Spray-drier: (1) Entrada de ar de secagem, (2) sistema de aquecimento, (3) bomba peristáltica, (4) ciclone, (5) atomizador, (6) controlador interno de temperatura, (7) controlador externo de temperatura, (8) coletor de produto, (9) compressor de ar, (10) câmara de secagem, (11) sistema de aspiração.

3.10 Análises microbiológicas

As amostras de carne mecanicamente separada recebidas foram submetidas a análises microbiológicas para verificar a contaminação total da matéria-prima, da carga de coliformes totais e fecais, através do método do número mais provável e da presença de bactérias do gênero *Salmonella sp.* Analisou-se também a carga microbiana presente no hidrolisado protéico em

pó, com o objetivo de verificar se os processos envolvidos contribuíram para a redução dos níveis de contaminação.

As análises para presença de coliformes foram realizadas seguindo a metodologia descrita por Silva et al. (1997) e a pesquisa de *Salmonella* foi realizada seguindo as recomendações de Brasil (1992).

3.10.1 Contagem total de microrganismos

Na contagem padrão em placas, utilizou-se o meio de cultura ágar padrão para contagem (PCA). Para cada diluição foram feitas placas em triplicata, incubando-se a 35 °C por 48 horas. As unidades formadoras de colônias foram contadas nas placas de mesma diluição que apresentaram entre 25 e 250 colônias. O resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g).

3.10.2 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais

A estimativa do número mais provável (NMP) está baseada na diluição desta amostra e posterior inoculação das diluições em tubos de ensaio contendo meio líquido apropriado. Os resultados são confrontados com a tabela do número mais provável que considera o número de tubos positivos e as diluições sucessivas, expressando-se os resultados em NMP por grama de amostra.

No teste presuntivo, buscou-se detectar a presença de microrganismos fermentadores de lactose utilizando-se os caldos “Caldo Lactosado” e/ou “Caldo Lauril Sulfato Triptose”, tendo a lactose como única

fonte de carbono. Após incubação por 24/48 horas a 35 °C, consideraram-se positivos os tubos com produção de gás. A partir dos tubos positivos, realizaram-se os testes confirmativos para coliformes totais e termotolerantes. Para o teste de coliformes totais utilizou-se o “Caldo Verde Brilhante Bile 2 %”, que, além de inibir a flora acompanhante indica o desenvolvimento de bactérias do grupo coliformes. Incubou-se a 35 °C por 48 horas. Para a determinação de coliformes termotolerantes utilizou-se o meio seletivo para *E.Coli*, o Caldo E.C, com incubação por 24 horas a 45,5 °C, em banho-maria. Consideraram-se os tubos positivos os que apresentaram produção de gás no seu interior.

A partir dos tubos positivos em caldo E.C, foi realizado o teste confirmativo para *E.coli*. Cada tubo positivo foi plaqueado em “Agar EMB” e incubado a 35 °C por 24 horas para posterior observação de colônias típicas de *E.coli*. As colônias típicas caracterizam-se por apresentarem centro preto, com ou sem brilho metálico. Duas colônias bem isoladas de cada placa foram passadas para tubos de ensaio com Agar padrão para contagem (PCA) inclinados e incubados a 35 °C por 24 horas. A partir das culturas puras em PCA, foi realizada a coloração de Gram e estas foram inoculadas nos meios Indol, VM, VP e Citrato para realização de provas bioquímicas.

3.10.3 Investigação de *Salmonella* sp.

A presença de *Salmonella* foi determinada em 25 gramas ou mL de amostra sob análise, no mínimo. O resultado positivo foi interpretado considerando o risco potencial que apresenta, o que significa impropriedade ao consumo do produto em questão.

O material sofreu pré-enriquecimento com água peptonada tamponada 1%, necessária para recuperação das células injuriadas durante processamento ou conservação. Incubou-se a 35 °C por 24 horas. Seguiu-se o enriquecimento seletivo em caldos “Selenito Cistina” e “Rappaport Vassiliadis” que favorecem a multiplicação de *Salmonellas* e ao mesmo tempo inibem e restringem o crescimento de outros microrganismos. Incubou-se a 42,5 °C por 24 horas.

O isolamento, por meio de plaqueamento, foi realizado utilizando os meios Agar Verde Brilhante, “Agar Hektoen”, todos incubados a 35 °C, por 24 horas. Por fim, fez-se a triagem das colônias suspeitas de *Salmonella* incubando-as por 24 horas a 35 °C nos meios “Agar TSI” e “Agar LIA” inclinados. A seguir, efetuaram-se as provas bioquímicas complementares de identificação exigidas pela legislação vigente. O resultado foi expresso como “presença” ou “ausência” de *Salmonella* nas amostras analisadas.

3.11 Análises físico-químicas

3.11.1 Umidade

A umidade foi realizada pelo método de dessecação em estufa a 105 °C para a amostra de carne *in natura*, segundo normas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985).

A umidade foi realizada através do método de Bidwel-Sterling, para as amostras homogeneizadas e para o hidrolisado bruto. A determinação de umidade foi feita por processo de destilação com tolueno, de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985).

3.11.2 Proteína

O teor de proteína foi determinado pelo método de Kjeldahl, empregando-se o fator 6,25 para a conversão de nitrogênio em proteína (AOAC, 1990).

3.11.3 Gordura

Determinada pela extração contínua com éter de petróleo em aparelho de Soxhlet (AOAC, 1995).

3.11.4 Carboidratos

Obtidos por diferença entre 100 e a soma dos resultados obtidos para umidade, cinzas, proteína e gordura.

3.11.5 Cinzas

Obtida por incineração em mufla a 550 °C, de acordo com as normas do instituto Adolfo Lutz (IAL,1985).

3.11.6 Fibras

Determinado pelo método ácido detergente, segundo AOAC (1990).

3.11.7 Aminoácidos

A análise de aminoácidos foi realizada pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL (Campinas, São Paulo). Pesou-se equivalente a 25mg de proteína da amostra e hidrolisou-se com 10 mL de HCL 6,0 N, à vácuo, a uma temperatura de 110 °C por 22 horas. A amostra foi recuperada em diluente pH

2,2 (marca Pickering). Uma alíquota de 25 µL foi injetada no analisador Dionex DX 300 para separação dos aminoácidos, em coluna de troca iônica e reação pós-coluna com ninidrina, usando-se como referência solução padrão de aminoácidos Pierce (Sparkman et al., 1958). A análise de triptofano foi realizada de acordo com Spies (1967).

3.12 Avaliação nutricional do hidrolisado protéico

Para o cálculo de alguns parâmetros nutricionais, como digestibilidade e quociente de eficiência líquida de proteína (NPR) foi realizado ensaio biológico utilizando ratos Wistar machos recém-desmamados (21 dias de idade), obtidos do Biotério Central da UFRGS. Três grupos compostos por 6 ratos cada, escolhidos de forma aleatória, foram utilizados. O primeiro grupo foi alimentado com uma dieta controle, utilizando-se caseína como proteína de referência. O segundo grupo foi mantido em dieta aprotéica e ao terceiro grupo foi fornecida ração com a proteína hidrolisada. O ensaio foi realizado por um período de 10 dias, onde os animais ficaram em gaiolas individuais. Os animais permaneceram em uma sala com temperatura de 20-22 °C com ciclos de 12 h de luz e 12 horas de escuro. Água e ração foram oferecidas *ad libitum*.

As dietas experimentais foram preparadas segundo Reeves et al. (1993), com 10 % de proteína e estão apresentadas na Tabela 6. As quantidades de proteína foram calculadas em função do conteúdo total de proteína na caseína e proteína hidrolisada utilizadas nas dietas. Todos os animais receberam ração composta por caseína durante um período de adaptação de dois dias antes do início do ensaio. As fezes dos animais foram coletadas a cada dois dias durante o período de ensaio, secas a temperatura

ambiente e após foram dessecadas em estufa, trituradas e o conteúdo de nitrogênio foi analisado pelo método de Kjeldhal (AOAC,1990).

Tabela 6: Composição das dietas experimentais utilizadas durante ensaio biológico.

<i>Ingredientes</i>	<i>Padrão Caseína</i>	<i>Grupo Aprotéico</i>	<i>Grupo Teste</i>
Proteína	11,86g	-	17,10g
Sacarose	10g	10g	10g
Óleo de Soja	7g	7g	7g
Fibra (celulose)	5g	5g	5g
Mistura Mineral	3,5g	3,5g	3,5g
Mistura Vitamínica	1,0g	1,0g	1,0g
L-cistina	0,3g	-	-
Bitartarato de colina	0,25g	-	-
Terbutil	0,0014g	0,0014g	0,0014g
Hidroquinona			
Amido	61,08g	73,50g	56,40g

3.12.1 Digestibilidade

A digestibilidade verdadeira foi determinada segundo Sgarbieri (1996) e expressa de acordo com as equações (4) e (5):

$$D_v = 100 \left(\frac{NI - NFa}{NI} \right) \quad (4)$$

Com

$$NFa = NF - NFe \quad (5)$$

nas quais,

D_v é a digestibilidade verdadeira (%);

NFa é o nitrogênio fecal de origem alimentar (g);

NFe é o nitrogênio fecal de origem endógena (g);

NI é o nitrogênio ingerido (g);

3.12.2 Quociente de eficiência líquida de proteína (NPR)

A NPR foi calculada de acordo com a equação (6), segundo Sgarbieri (1996):

$$NPR = \frac{\text{Ganho Peso (g) GI} + \text{Perda Peso (g) GII}}{\text{Proteína Consumida (g)}} \quad (6)$$

onde : GI é a dieta protéica e $GI I$ é a dieta aprotéica.

3.12.3 Eficiência de alimento, utilização de alimento, utilização de proteína.

Os cálculos para a eficiência de alimento, utilização de alimento e proteína foram obtidos a partir dos resultados do ensaio biológico, como mostrado abaixo, segundo Sogi et al. (2005):

Eficiência de alimento = Ganho de peso (g) / alimento ingerido (g);

Utilização de alimento = alimento ingerido (g) / ganho de peso (g);

Utilização de proteína = proteína ingerida (g) / ganho de peso (g);

3.12.4 Índices de digestibilidade protéica corrigida pelos escores de aminoácidos (PDCAAS)

Os valores de PDCAAS foram determinados como propostos pela FAO (1985), usando o requerimento de aminoácidos essenciais para crianças

de 2 a 5 anos como padrão e considerando os índices de digestibilidade verdadeira obtida nos ensaios biológicos.

PDCAAS= [(mg de aminoácidos essenciais ⁽¹⁾ em 1g de proteína teste)/(mg de aminoácidos essenciais⁽¹⁾ em 1 g de proteína de referência⁽²⁾)] *
digestibilidade verdadeira

Onde:

⁽¹⁾ aminoácidos essenciais para humanos,

⁽²⁾ requerimentos para crianças de 2 a 5 anos.

3.13 Gel filtração

A etapa de gel filtração do hidrolisado foi realizada em duas colunas: Sephadex G 100 (Amersham Bioscience) e Sephadex G 25 (Amersham Bioscience), ambas com volume de leito de 97 mL (1,5 x 55 cm). Em Sephadex G100 os seguintes parâmetros de separação foram aplicados: volume da amostra 2,0 mL (1,147 mg.mL⁻¹ de proteína), eluente tampão fosfato 0,1 M a pH 7,0, fluxo de eluição 0,35 mL.min⁻¹ e fração coletada de 3,0 mL. Após a passagem em G-100, as frações de números 10 a 25 (30 a 75 mL de eluição) foram coletadas e liofilizadas para posterior utilização na mesma coluna empacotada com a resina Sephadex G 25 (Amersham Bioscience). Os parâmetros de separação utilizados em G-25 foram: volume da amostra 1,5 mL (0,915 mg.mL⁻¹ de proteína), fluxo de eluição 2,5 mL.min⁻¹, fração coletada de 3,0 mL e eluente tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. As frações foram coletadas em um coletor de frações (Modelo "2128 Fraction Collector", Bio-Rad, Laboratories) e analisadas em espectrofotômetro (Ultrospec 3100, Amersham Bioscience) a 280 nm. Os padrões de pesos moleculares utilizados para Sephadex G 100

foram: BSA, (67000 Da); Ovoalbumina, (45000 Da); Inibidor de Tripsina, (21000 Da); Citocromo C, (12000 Da); Triptofano, (204 Da). Para o gel filtração do hidrolisado em Sephadex G 25 os seguintes padrões foram utilizados: Citocromo C, (12000 Da); Insulina humana (5807 Da) e Triptofano (204 Da).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de protease por *Bacillus*

Os primeiros ensaios realizados utilizando extrato solúvel de soja como fonte de carbono para a produção de protease foram insatisfatórios, não ocorrendo crescimento do microrganismo. Este mesmo meio foi suplementado com extrato de levedura e peptona, porém os resultados também não foram significativos.

Os meios suplementados com amido e glicose, como fonte de carbono, tiveram resultados satisfatórios para a atividade proteolítica. As maiores atividades foram verificadas com o *B. circulans* BL 53, onde os valores atingiram 9,25 U.mL⁻¹, em 72 horas, utilizando amido como fonte de carbono e 22,11 U.mL⁻¹, em 50 horas, utilizando glicose. As Figuras 3 e 4 mostram as atividades enzimáticas (U.mL⁻¹), obtidas para os microrganismos *B. circulans* BL 53 e *Bacillus sp.* BL 13, em meio amido e glicose, respectivamente.

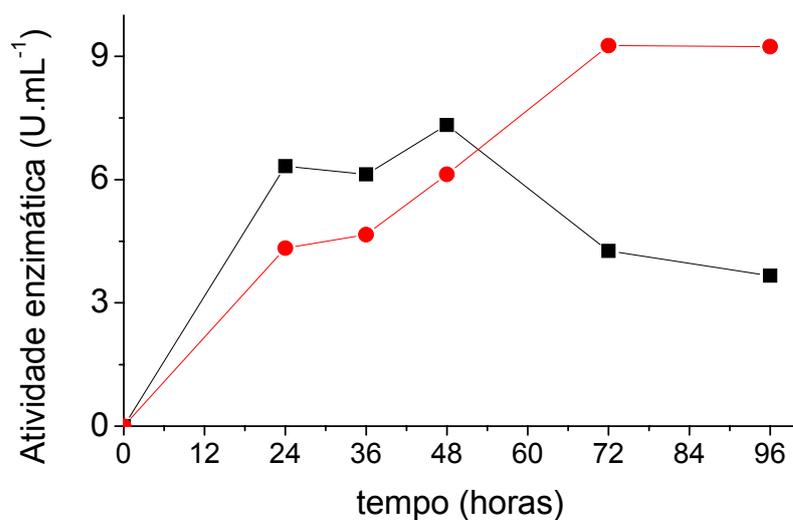


Figura 3: Atividade enzimática de culturas de *Bacillus circulans* BL 53(-●-) e *Bacillus sp.* BL 13 (-■-) em meio contendo amido.

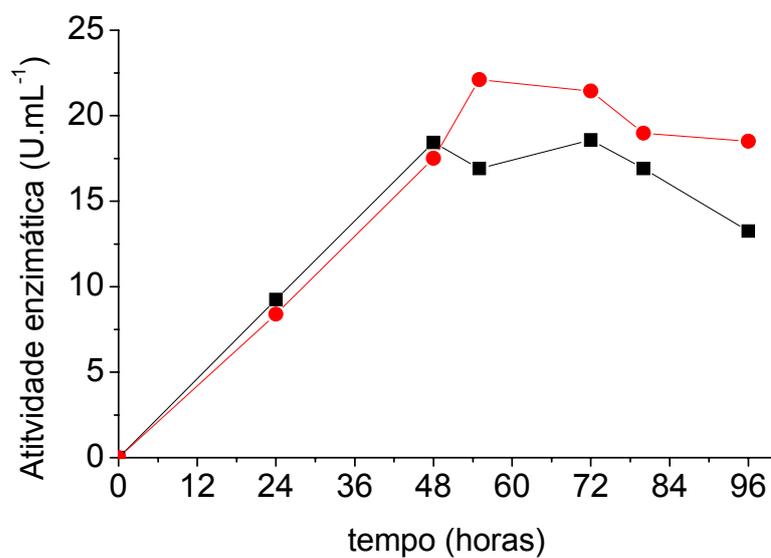


Figura 4: Atividade enzimática de culturas de *Bacillus circulans* BL 53 (-●-) e *Bacillus sp.* BL 13 (-■-), em meio contendo glicose.

Muitas bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* excretam grandes quantidades de enzimas no meio de cultura. A protease Subtilisin Calsberg, é excretada no meio por um tipo de *Bacillus licheniformis* ou *B. pumilus* no começo da fase estacionária (Mabrouk et al., 1999). As proteases produzidas por *Bacillus spp.*, incluindo *B.subtilis* e *B.firmus* são o mais importante grupo de enzimas que estão sendo exploradas atualmente (Yang et al., 2000).

Segundo Yang et al. (2000) a produção de uma protease de *Bacillus subtilis* usando resíduos de crustáceos como fonte de carbono em pH 6,0, temperatura de 30 °C e três dias de cultivo alcançou atividade de 20,2 U.mL⁻¹. A protease foi purificada e teve um rendimento total de 18 %, alcançando uma atividade específica de 39,4 U/mg de proteína. Os resultados obtidos neste projeto com *B. circulans* BL 53, em meio contendo glicose (22,11 Um.L⁻¹) foram superiores aos encontrados pelo autor acima citado. Al-Shehri et al. (2004), utilizando *Bacillus licheniformis* em meio de cultivo caseína obteve uma produção máxima de 221 U.mL⁻¹ depois de 36 horas de cultivo em pH 8,0 e temperatura de 50 °C.

As enzimas comerciais são enzimas produzidas com microrganismos de reconhecida atividade proteolítica, como a enzima Alcalase, produzida por *Bacillus licheniformis*. Além disso, são enzimas que passaram por processos de purificação, o que aumenta a atividade proteolítica. Não existem literaturas citando as linhagens de BL como produtoras de protease e, neste projeto, foi realizada somente a análise da atividade enzimática. Com isso, para uma futura utilização destes microrganismos como proteases, são

necessários estudos mais detalhados, os quais não cabem no projeto em questão.

De posse destes resultados, decidiu-se optar em não utilizar as proteases das linhagens BL e concentrar-se apenas nas enzimas comerciais.

4.2 Planejamento experimental da hidrólise enzimática

Embora muitos fatores afetem o rendimento dos hidrolisados, o tipo de enzima tem efeito marcante nas propriedades do produto final. Das duas enzimas utilizadas, a Alcalase obteve melhores rendimentos. A Tabela 7 mostra os tratamentos realizados, as variáveis codificadas e o índice de hidrólise (IH) para as enzimas testadas.

Para Alcalase, os coeficientes de regressão mostram que temperatura (x_1), pH (x_2) e concentração de enzima (x_3) tiveram efeitos lineares e quadráticos nos valores do índice de hidrólise. Nenhuma interação entre os parâmetros foi observada. Para a enzima Flavourzyme, pH não teve efeito linear nos valores do índice de hidrólise, porém teve efeito quadrático. Interações entre as variáveis foram observadas somente entre a temperatura e concentração de enzima. Após a eliminação dos fatores com $p > 0,05$, as equações obtidas para o IH com as enzimas Alcalase e Flavourzyme estão representadas nas Eq.(7) e Eq.(8), respectivamente:

$$\hat{y} = 0,751 + 0,0236 x_1 + 0,0115 x_2 + 0,0304 x_3 - 0,0227 x_1^2 - 0,00838 x_2^2 - 0,0471 x_3^2 \quad (7)$$

$$\hat{y} = 0,549 + 0,0181 x_1 + 0,0159 x_3 + 0,00537 x_1 x_3 - 0,0145 x_1^2 - 0,0108 x_2^2 - 0,0135 x_3^2 \quad (8)$$

Tabela 7: Planejamento Experimental para a hidrólise enzimática de CMSF.

Tratamentos	Variáveis codificadas ^a			Alcalase	Flavourzyme
	x_1	x_2, x_2'	x_3	IH	IH
1	-1	-1	-1	0,608	0,497
2	+1	-1	-1	0,692	0,512
3	-1	+1	-1	0,654	0,497
4	+1	+1	-1	0,713	0,523
5	-1	-1	+1	0,642	0,498
6	+1	-1	+1	0,732	0,540
7	-1	+1	+1	0,685	0,507
8	+1	+1	+1	0,736	0,549
9	0	0	0	0,750	0,553
10	0	0	0	0,760	0,552
11	0	0	0	0,750	0,547
12	-1,68	0	0	0,663	0,466
13	+1,68	0	0	0,686	0,539
14	0	-1,68	0	0,702	0,509
15	0	+1,68	0	0,728	0,517
16	0	0	-1,68	0,520	0,460
17	0	0	+1,68	0,691	0,551

^a x_1, x_2, x_2', x_3 representam a temperatura, pH para Alcalase, pH para Flavourzyme e concentração de enzima, respectivamente.

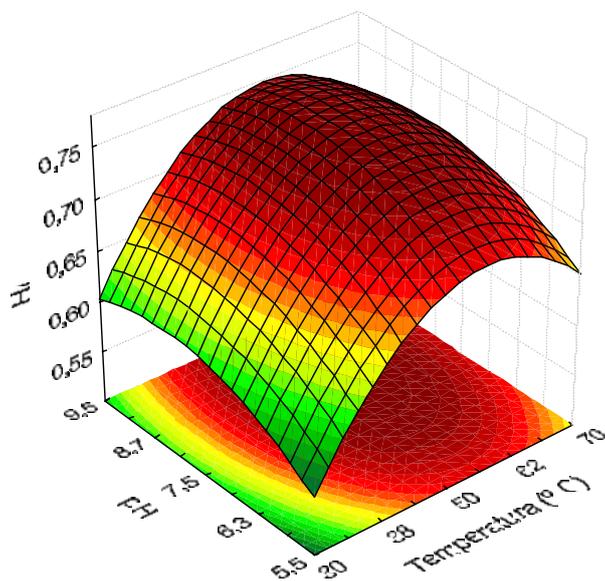
^b x_2, x_2' - Possuem as mesmas variáveis codificadas.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) para o índice de hidrólise da Alcalase e Flavourzyme demonstraram que o modelo é significativo no intervalo de pontos em que foi estudado, já que os valores de F para Alcalase e Flavourzyme, respectivamente, (8,77 e 10,44) foram maiores que o valor de F tabelado (3,22), ao nível de 95 % de significância. Os coeficientes de determinação (R^2 de 0,840 para Alcalase e R^2 de 0,862 para Flavourzyme),

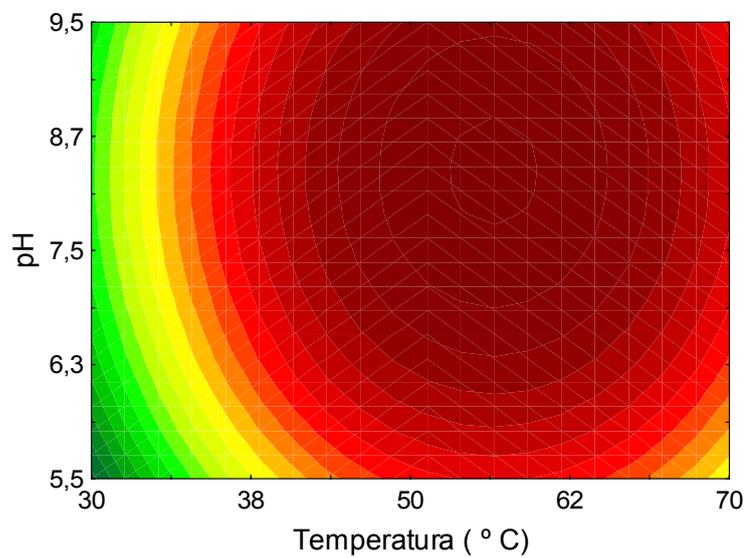
asseguram um ajustamento do modelo quadrático aos dados experimentais e indicam que 84 % e 86,2 % da variação total pode ser explicada pelo modelo. O Apêndice 2 mostra os resultados obtidos pela análise de variância das duas enzimas.

A validação dos resultados do modelo foi feita pela resolução das equações 7 e 8, obtendo-se valores preditos de 0,760 para alcalase e 0,560 para Flavourzyme, que quando comparados com os valores experimentais (0,734 para alcalase e 0,550 para Flavourzyme) indicaram que o modelo é válido para o intervalo estudado (Apêndice 3). As figuras 5 ,6 e 7 mostram as superfícies de resposta e contorno para a enzima Alcalase e as figuras 8, 9 e 10 mostram as superfícies de resposta e contorno para a enzima Flavourzyme, respectivamente.

As Figuras 5, 6 e 7 mostram os efeitos das variáveis temperatura, pH e concentração da enzima sobre o índice de hidrólise. Através das superfícies de contorno, pode-se analisar melhor a condição de trabalho estabelecida. A região vermelha indica a faixa ótima de trabalho para a temperatura, o qual está entre 50 °C a 65 °C, o pH está entre 7,0 e 9,5 e a concentração da enzima entre 2,0 e 4,0 %. O maior valor para o índice de hidrólise foi alcançado nas seguintes condições: temperatura de 50 °C, pH 7,5 e concentração de enzima de 2,5%.

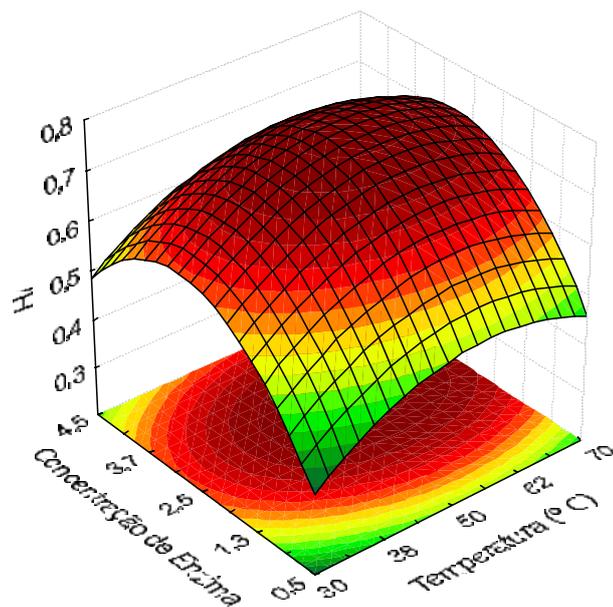


(a)

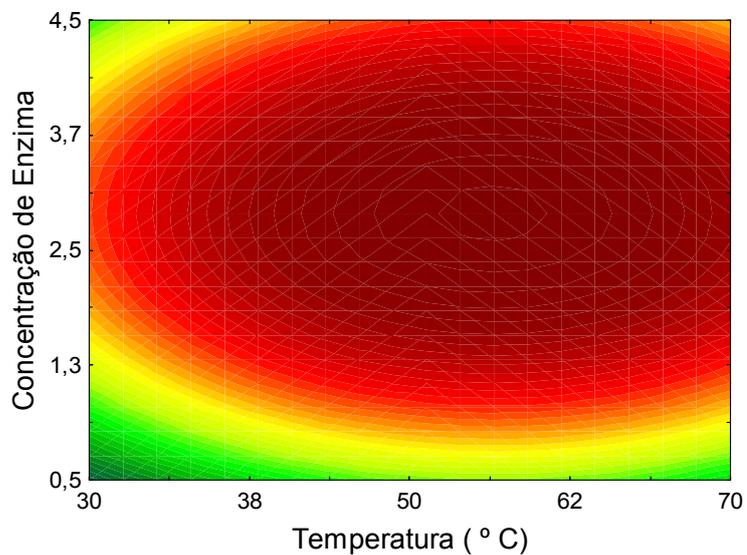


(b)

Figura 5: Superfície de resposta (a) e contorno (b) para a obtenção do índice de hidrólise (IH) utilizando a enzima Alcalase: Interação entre pH x T (°C).

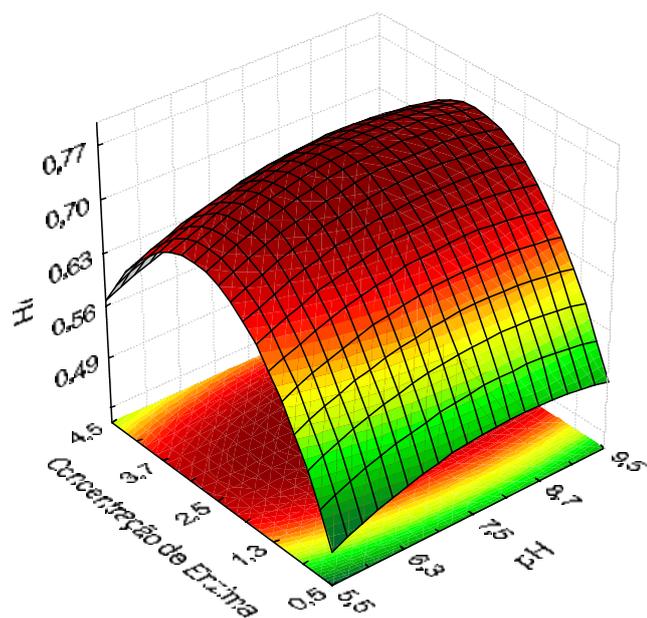


(a)

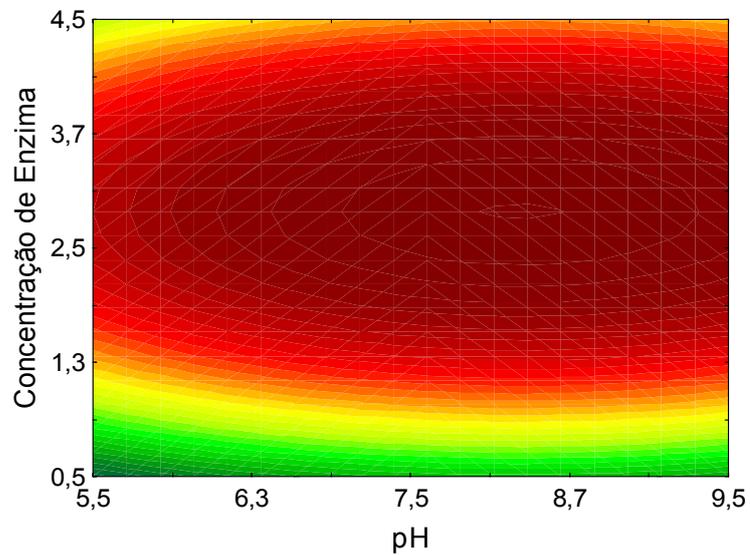


(b)

Figura 6: Superfície de resposta (a) e contorno (b) para a obtenção do índice de hidrólise (IH) utilizando a enzima Alcalase: Interação entre T (°C) x (E).

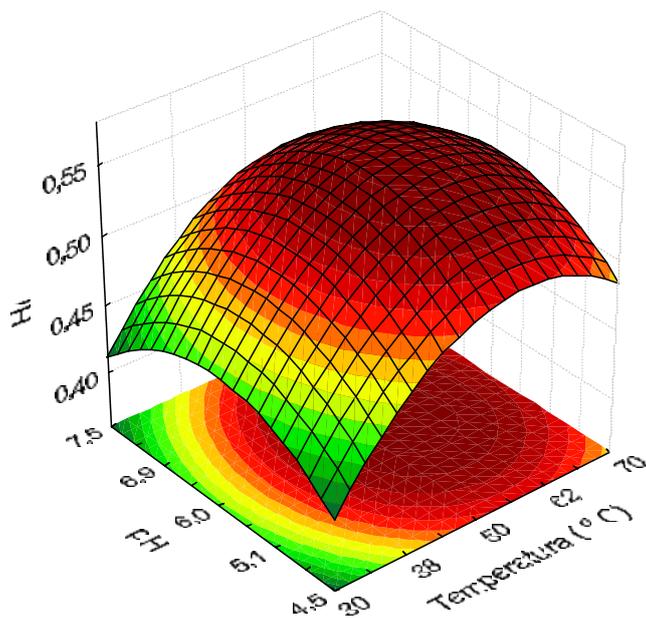


(a)

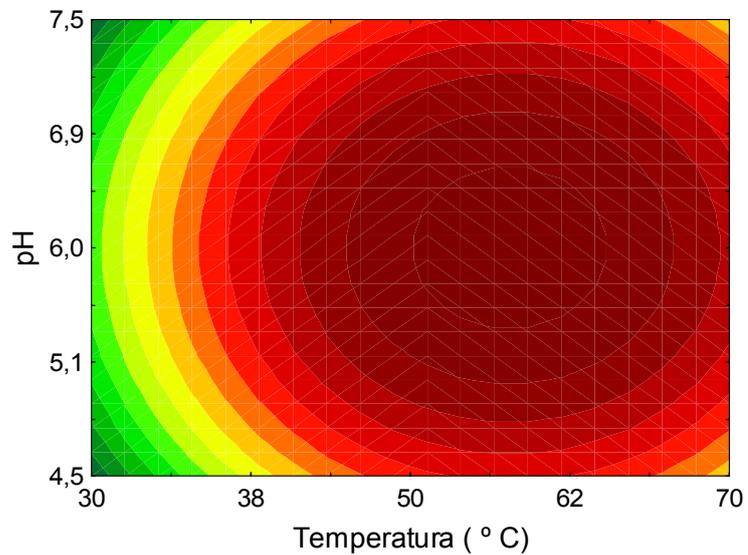


(b)

Figura 7: Superfície de resposta (a) e contorno (b) a para obtenção do índice de hidrólise (IH) utilizando a enzima Alcalase: Interação entre (E) x pH.

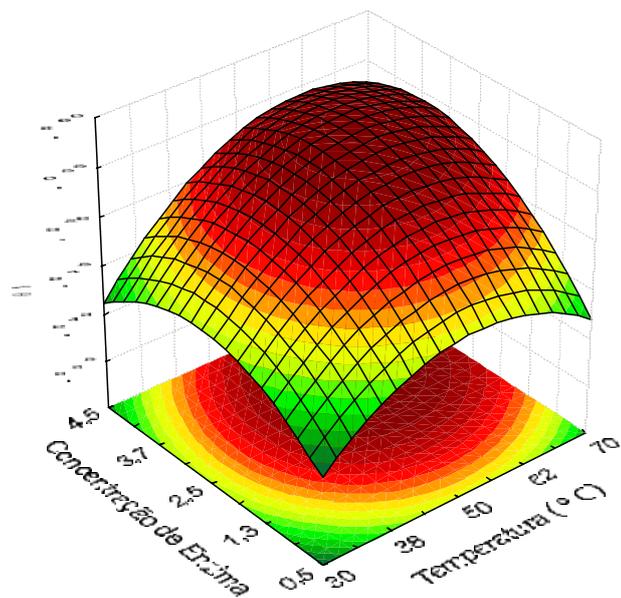


(a)

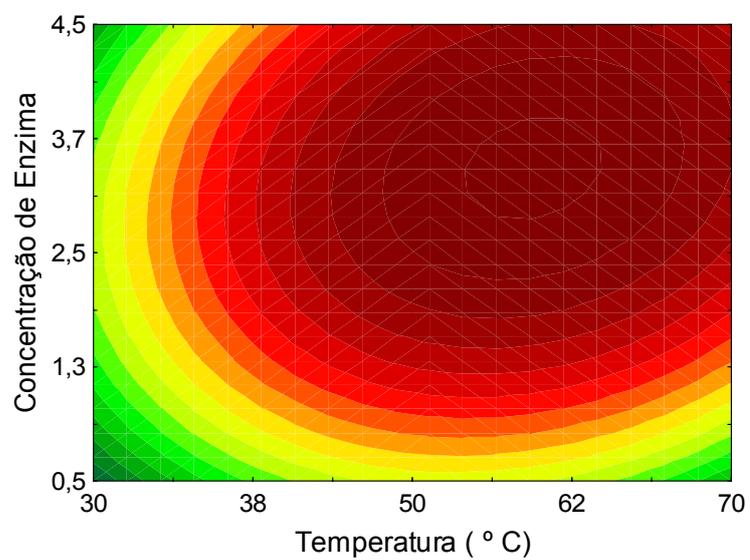


(b)

Figura 8: Superfície de resposta (a) e contorno (b) para a obtenção do índice de hidrólise (IH) utilizando a enzima Flavourzyme: Interação entre pH x T (°C).

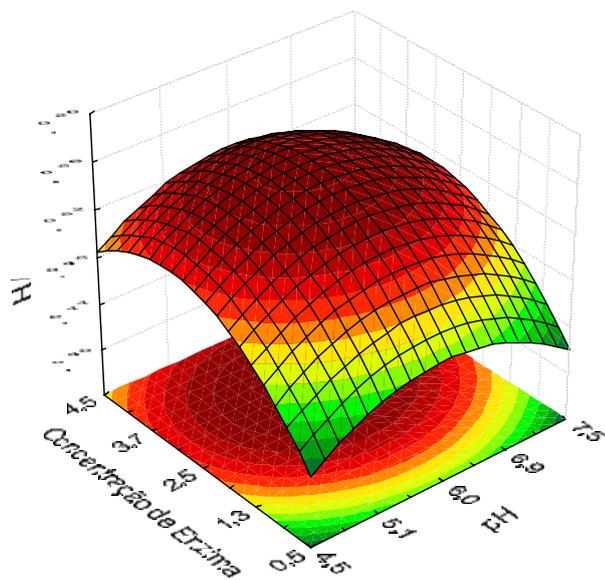


(a)

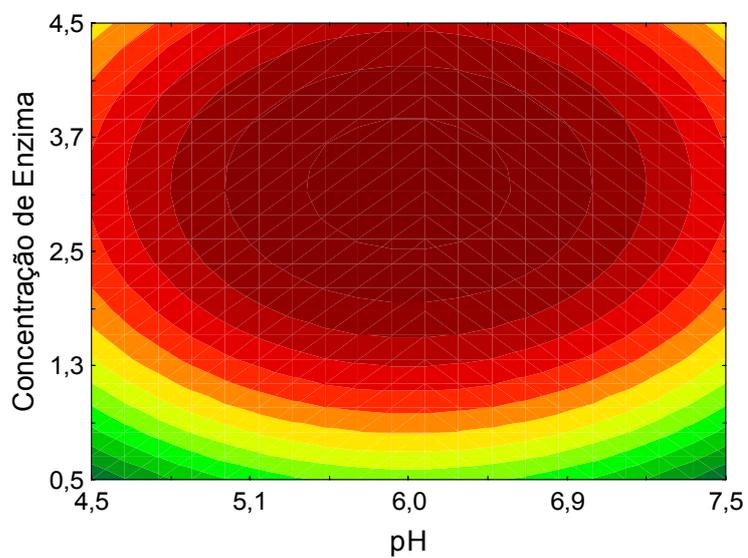


(b)

Figura 9: Superfície de resposta (a) e contorno (b) para a obtenção do índice de hidrólise (IH) utilizando a enzima Flavourzyme: Interação entre T(° C) x (E).



(a)



(b)

Figura 10: Superfície de resposta (a) e contorno (b) para a obtenção do índice de hidrólise (IH) utilizando a enzima Flavourzyme: Interação entre (E) x pH.

Para a enzima Flavourzyme as superfícies de contorno também evidenciaram a região ótima de trabalho (Figuras 8, 9 e 10). As faixas de trabalho para a enzima Flavourzyme foram: temperatura entre 50 °C até 65 °C, pH de 5,0 a 7,0 e a concentração da enzima de 2,0 a 4,5%. O máximo índice de hidrólise foi obtido a temperatura de 50 °C, pH 6,0 e concentração de enzima 3,5%.

A faixa ótima de temperatura sugerida pelo fabricante das enzimas (Novo Nordisk, 1996) para a enzima Alcalase é: temperatura de 55-70 °C e pH entre 6,5-8,5. Para a enzima Flavourzyme a faixa de trabalho indicada é de temperatura de 50-55 °C e pH entre 5,0 a 7,0. Os valores ótimos podem variar com a utilização de diferentes substratos. Os resultados encontrados na otimização estão de acordo com os citados pelo fabricante, já que as faixas ótimas para as duas enzimas encontram-se dentro dos intervalos acima citados.

O aumento da concentração de enzima até 4 % resultou em maiores valores de índice de hidrólise e proteína solúvel. Para concentrações de enzima maiores, observou-se um sensível decréscimo. Este fato pode ser explicado pela possível inibição da hidrólise de proteínas pela presença de produtos ou pela clivagem total de todas as ligações peptídicas disponíveis (Shahidi et al., 1995). Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Diniz & Martin (1998), trabalhando com proteína de músculo de tubarão, que observaram um decréscimo nos valores de recuperação protéica e do grau de hidrólise com valores de enzima/substrato acima de 4% (p/p). Rebeca et al., (1991), trabalhando com hidrolisado de peixe e utilizando as enzimas Protease,

Pescalase 500 e HT-Proteolítico também observaram que com o aumento da concentração de protease o aumento de nitrogênio solúvel foi diminuído.

4.3 Eficiência de recuperação protéica

Alcalase e Flavourzyme são proteases que possuem atividades de endoproteases e de endo e exoproteases, respectivamente. Em proteínas hidrolisadas, aplicações de endoproteases são dominantes (Nilsang et al., 2005).

O procedimento de hidrólise resultou em boa solubilização do substrato utilizado. A Figura 11 mostra as curvas de proteína solúvel, para ambas as enzimas, obtidas no ponto central do planejamento experimental. O Apêndice 4 mostra os valores de proteína solúvel e índice de hidrólise para os demais tratamentos realizados. As curvas de hidrólise foram caracterizadas por aumento na solubilização até, 60 minutos, tempo no qual grande número de ligações peptídicas foi hidrolisado. A solubilização foi estabilizando gradativamente e alcançou a fase estacionária onde não ocorreu hidrólise aparente, após duas horas. Moreno & Cuadrado (1993) sugerem que esta tendência das curvas de hidrólise podem ser atribuídas ao decréscimo das ligações peptídicas disponíveis para a hidrólise, diminuição da atividade enzimática e/ou inibição por produto. Esta sensível diminuição da solubilização pode ocorrer também devido a uma agregação e precipitação dos peptídeos formados com conseqüente redução na quantidade de proteína solúvel.

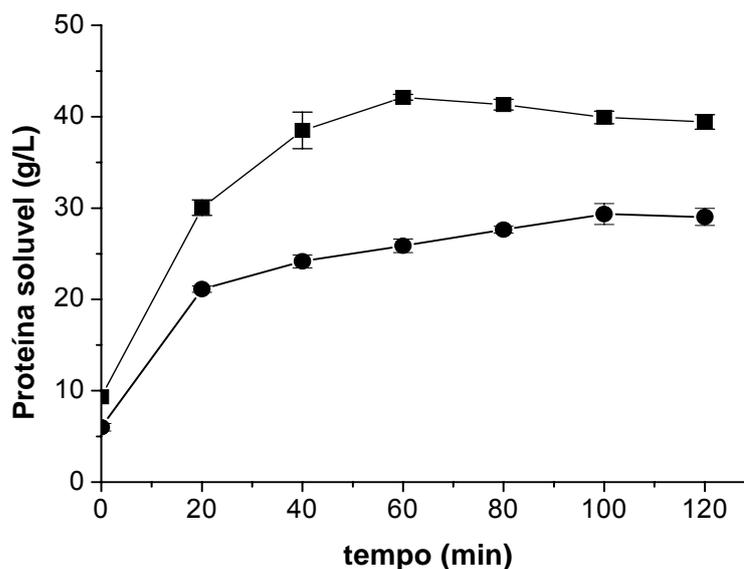


Figura 11: Curvas de proteína solúvel (g/L) a temperatura de 50 °C, concentração de enzima de 2,5 % e pH 7,5 para Alcalase (- ■ -) e pH 6,0 para Flavourzyme (-●-). As curvas são as médias da triplicata do ponto central.

Rebeca et al. (1991) citam que a manutenção estável do pH durante o processo de hidrólise mediante a adição de NaOH previne a queda do pH e resulta em solubilização mais rápida e duradoura. Nos experimentos realizados para a otimização do processo de hidrólise, não houve a manutenção do pH e os valores de pH finais medidos, situaram-se em torno de 6,4. Este fato pode ter contribuído para a rápida solubilização da proteína, visto que após 60 min houve decréscimo na solubilização protéica, o que poderia não ter acontecido se fosse feita a manutenção do pH de trabalho.

A enzima Alcalase alcançou 89 % de recuperação protéica e a enzima Flavourzyme obteve recuperação protéica de 66,5 %. Os resultados de solubilização protéica foram satisfatórios, quando comparados com a literatura. Sales et al. (1991), utilizaram as enzimas Alcalase, Neutrase, Papaína e

Pepsina para a extração da proteína do resíduo de carne de frango separada mecanicamente. A reação foi conduzida a 50 °C, e o pH constante em 8,0 para Alcalase e 7,5 para Papaína. A Alcalase foi aplicada nas concentrações de 2,5 % e 5 % e a Papaína em 0,7 % e 1,5 % sobre o substrato contendo 8 % de proteína. O hidrolisado obtido com Alcalase obteve rendimento de 80,1 % na concentração de 2,5 %, sendo que não houve aumento significativo a 5 %. A enzima Papaína obteve rendimento de 83 %, e aumento significativo quando se dobrou a concentração. O produto final apresentou teores elevados de glicina, valina e alanina. Os autores sugeriram o uso deste hidrolisado para pessoas com dieta restrita de aminoácidos aromáticos.

Soares (1998) usando Alcalase isoladamente e uma combinação de Alcalase + Flavourzyme, a 0,6% de adição de enzima, pH 7,0 e temperatura de 50 °C, obteve recuperação em torno de 62 % de proteína solubilizada. Quando este mesmo autor usou 1,20 % de enzima, os resultados foram mais eficientes: Alcalase alcançou 66,4% e a combinação Alcalase + Flavourzyme alcançou 69,6 % de proteína solubilizada.

Nilsang et al. (2005) produziu um hidrolisado solúvel de peixe com Flavourzyme a 45 °C e concentração de enzima de 5 % e o pó produzido após atomização continha alto conteúdo de proteína (66%). Com isolados de soja, Adler-Nissen (1976) conseguiu 65-75% de proteína solubilizada usando Alcalase a 55 °C, pH 8,0 e concentração de enzima 2%.

A solubilidade da proteína depende de vários fatores como peso molecular e conformação das moléculas, densidade e distribuição de cargas pH e temperatura, força iônica e constante dielétrica do solvente. As proteínas

são em geral mais solúveis em pHs baixos (ácidos) ou elevados (básicos) devido ao excesso de cargas positivas ou negativas a esses pHs. Excesso de cargas de mesmo sinal produz repulsão das moléculas, que contribui para sua maior solubilidade (Sgarbieri, 1996). Tratamentos alcalinos podem induzir ao excesso de cargas negativas nas cadeias peptídicas, produzindo repulsão entre as moléculas, conduzindo então a maior hidratação. Aquecimentos desnaturam parcialmente a proteína e as cadeias peptídicas podem abrir-se, permitindo maior hidratação. Entretanto, a combinação de ambos os tratamentos contribui para a maior solubilidade da proteína do músculo e aumenta a sua extração (Xia et al., 2007).

Segundo Mahmoud (1994), o aumento da solubilidade é benéfico na confecção de fórmulas infantis hipoalergênicas e em outros produtos nutricionais contendo hidrolisados aonde açúcares redutores, como maltodextrinas, são necessários para controlar a osmolaridade.

Embora a otimização tenha fornecido bons resultados para ambas as enzimas testadas, a Alcalase foi escolhida para a produção do hidrolisado de CMSF pela sua maior eficiência de recuperação protéica quando comparada à enzima Flavourzyme. As condições usadas para a produção do hidrolisado foram: temperatura de 50 °C, pH 8,0 e concentração de enzima de 2,0 %. A porcentagem de enzima foi reduzida para minimizar o custo, porém, o valor utilizado situa-se dentro da faixa ótima encontrada no planejamento experimental.

4.4 Avaliação da contaminação microbiológica

A carne mecanicamente separada de frango utilizada neste trabalho apresentou, de maneira geral, carga microbiana total, determinada pela contagem padrão em placas, inferior ao reportado por Surówka & Fik (1992). A Tabela 8 apresenta as análises realizadas nos lotes recebidos.

Tabela 8: Resultado das análises microbiológicas dos diferentes lotes de CMSF recebidos.

<i>Análises Microbiológicas</i>	<i>1º lote de CMS</i>	<i>2º lote de CMS</i>	<i>3º lote de CMS</i>	<i>4º lote de CMS</i>	<i>5º lote de CMS</i>
Contagem padrão em placas (PCA) a 35 °C (UFC/g amostra)	2,67x10 ⁴	4,11. 10 ⁴	3,21. 10 ⁴	1,27. 10 ⁴	2,95. 10 ⁴
Coliformes totais (NMP)	>2400/g	150/g	460/g	460/g	460/g
Coliformes fecais (NMP)	>2400/g	150/g	93/g	460/g	150/g
E.coli (confirmativo)	+	+	+	+	+
Presença de <i>Salmonella</i> s _x	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente

Considerando-se que a legislação em vigor da ANVISA (2001), utiliza o plano de amostragem, a comparação dos resultados foi realizada utilizando-se a legislação de Brasil (1997), o qual utiliza a metodologia do número mais provável. De acordo com esta legislação, o limite máximo estabelecido para coliformes fecais é de 5.10² NMP/g para produtos cárneos crus resfriados sendo considerado impróprio para consumo. Entre 100 e 500 NMP/g o produto é considerado como condições higiênicas insatisfatórias. De acordo com a legislação, apenas o primeiro lote excedeu o valor máximo. Os demais lotes, com exceção do 3º, podem ser considerados como condições

higiênicas insatisfatórias, confirmando que a CMSF não possui uma qualidade microbiológica aceitável.

Para a pesquisa de *Salmonella* sp., todos os lotes testados apresentaram resultado negativo, de acordo com ANVISA (2001), indicando que este material poderia ser destinado ao consumo humano, porém de acordo com a análise para coliformes as condições higiênicas são insatisfatórias, necessitando de um melhor controle na sanitização. Hoffmann et al. (2002), avaliando a qualidade microbiológica de CMS e carcaças de frango, não detectaram *Salmonella*, descartando a possibilidade desta ser uma fonte de contaminação. Quando a positividade do resultado é confirmada, a justificativa pode ser dada pela introdução no abatedouro de aves já contaminadas, pelas deficiências em instalações e precárias condições de higiene durante o abate, como água, manipulação das carcaças, que facilitam a proliferação destes microrganismos, refletindo desta maneira na contaminação da matéria-prima.

Avaliando a qualidade microbiológica de carnes de aves mecanicamente separadas, Ostovar et al. (1971) determinaram que a contaminação do material imediatamente após a separação era de $3,25 \cdot 10^5$ UFC/g e de 40 coliformes fecais/g de amostra. A conservação por doze dias a 3°C proporcionou um aumento na contagem total de microrganismos alcançando o valor de $9,32 \cdot 10^6$ UFC/g, enquanto a quantidade de coliformes fecais permaneceu constante. Quando o produto foi armazenado a -15°C , observou-se uma redução na quantidade de microrganismos totais e de coliformes fecais. Somente seis das 54 amostras foram contaminadas com bactérias do gênero *Salmonella* sp.

Surówka & Fik (1992) citam que as preparações protéicas podem ser um bom meio nutriente para os microrganismos, sendo de fundamental importância que estes produtos tenham elevada qualidade microbiológica. Os resultados experimentais indicaram que as condições de hidrólise empregadas e os tratamentos térmicos, sucessivamente, podem ter auxiliado na redução da contagem microbiana nos vários estágios de produção do hidrolisado.

Na amostra submetida à secagem em spray-drier, ocorreu à eliminação total de bactérias do grupo coliformes. Estes resultados estão de acordo com Soares (1998) e Surówka & Fik (1994). A Tabela 9 mostra os vários estágios da produção do hidrolisado.

Tabela 9: Contagem microbiana em vários estágios na produção do hidrolisado.

	<i>Contagem microbiana</i>			
	CMS	Após hidrólise*	Após inativação da enzima**	Após secagem
Contagem padrão em placas (PCA) a 35°C (UFC/g amostra)	2,84.10 ⁴	3,3.10 ³	-	1,3.10 ⁴
Coliformes Totais (NMP)	460/g	4/g	-	-
Termotolerantes (NMP)	150/g	<3/g	-	-
<i>Salmonella</i> sp.	negativo	n.d	n.d	negativo

* 50 °C, pH 8.0, 2 h ** 90 °C, 20 min, n.d= não determinado

Em relação à contagem padrão em placas, houve um decréscimo após a hidrólise e não houve contagem após a inativação, porém os valores para contagem em placas aumentaram para o produto seco. Isto pode ser devido ao aparelho de secagem, no qual os dispositivos eram lavados apenas

com água, a manipulação do produto na retirada do frasco coletor também pode ter acarretado aumento na contagem e a própria contaminação ambiental podem ter sido fatores que contribuíram para o aumento deste valor.

A contagem padrão feita em PCA, um meio não seletivo, indica o crescimento de qualquer tipo de microrganismo, bactérias, leveduras, algumas formas esporuladas entre outros. Esta tem sido usada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos, fornecendo também idéia sobre seu tempo útil de conservação. A deterioração de alimentos pode ser causada pelo crescimento de microorganismos que levariam a alterações organolépticas. A maioria dos alimentos apresenta, números de microrganismos superiores a 10^6 UFC/g de alimento, quando alterações organolépticas são detectáveis. Entretanto, há aqueles alimentos em que são necessários 10^7 ou até mesmo 10^8 UFC/g de alimento para que se notem alterações (Franco & Landgraf, 1996).

De acordo com a ANVISA (2000), os limites estabelecidos para administração de nutrição enteral são os seguintes: microrganismos aeróbios mesófilos menor que 10^3 UFC/g, *Bacillus cereus* menor que 10^3 UFC/g, *E.coli* menor que 3 UFC/g e bactérias do gênero *Salmonella sp.* devem estar ausentes. O hidrolisado obtido mesmo estando livre da contaminação por *Salmonella sp.* e por bactérias do grupo coliformes, não poderia ser ministrado como alimento enteral, de acordo com a legislação, já que obteve contagem microbiana acima do limite. A necessidade de melhor controle na sanitização de todas os equipamentos utilizados para a obtenção do produto,

principalmente o de secagem, pode fazer com que este produto alcance melhor qualidade microbiológica.

Avaliando a qualidade microbiológica em preparações enterais em um hospital, onde 20 amostras de dietas enterais industrializadas foram analisadas, Lima et al. (2005), encontraram valores de coliformes totais e *E.Coli* acima dos limites fixados pela ANVISA (2000), indicando alta representatividade diante dos limites estabelecidos. Estes produtos devem estar livres de contaminação, devido aos riscos que podem causar em pacientes submetidos à ingestão destas fórmulas, tais como diarreias, vômitos, distensão abdominal, colonização do trato gastrointestinal podendo causar infecção e sepse.

4.5 Avaliação bromatológica da matéria-prima e do hidrolisado em pó

A Tabela 10 apresenta os resultados das análises bromatológicas realizadas nos lotes de CMSF recebidos durante os ensaios de hidrólise. As análises foram feitas em duplicata e estão representadas em base úmida.

A carne mecanicamente separada apresentou quantidade de proteína média de 11,83% e 20,21 % de gordura. De acordo com Brasil (2000), a CMS deve apresentar no mínimo 12% de proteína e no máximo 30% de gordura. Na literatura foram encontrados valores para CMS variando de 9,3 - 14,5 % de proteína e 14,4 - 27,2 % de gordura, sendo a matéria prima pescoço e dorso de frango, respectivamente (Froning, 1981).

Tabela 10: Resultados das análises bromatológicas realizadas nos lotes de CMSF utilizados no experimento.

<i>Análises</i>	<i>1º lote</i>	<i>2º lote</i>	<i>3º lote</i>	<i>4º lote</i>	<i>5º lote</i>	<i>Média</i>
<i>físico- químicas</i>	<i>CMS (%)</i>	<i>(%)</i>				
Umidade	68,92	60,99	60,62	65,73	62,00	63,65
Proteína	10,62	11,36	11,94	11,73	13,54	11,83
Gordura	17,67	22,40	19,45	20,25	21,29	20,21
Cinzas	0,77	0,81	0,76	0,85	0,71	0,78
Fibra	0,26	0,57	0,46	0,51	0,51	0,46
pH	6,69	6,57	6,47	6,75	6,53	6,60
Extrato seco	31,08	39,01	39,38	34,27	38,00	36,34

O hidrolisado em pó obtido possui em torno de 58 % de proteína. Estes valores estão de acordo com outros trabalhos que relatam quantidades de proteínas na faixa de 45-85 %, trabalhando com CMSF e cabeças de frango (Sales et al., 1991; Surówka & Fik, 1994, Soares et al., 2000). A Tabela 11 apresenta a composição da carne mecanicamente separada e do hidrolisado protéico em pó.

O conteúdo de lipídios no hidrolisado, após centrifugação, foi grandemente reduzido quando comparado com as amostras de carne mecanicamente separada. Segundo Nilsang et al. (2005), a maior parte dos lipídios podem ter sido excluídos junto com proteínas insolúveis no processo de centrifugação. O baixo conteúdo de lipídios pode aumentar a estabilidade de armazenamento do produto.

Tabela 11: Composição da carne mecanicamente separada de frango (CMSF) e do hidrolisado protéico em pó.

<i>Composição (%)</i>	<i>CMSF^a</i>	<i>Hidrolisado Protéico^b</i>
Umidade	63,65	6,92
Proteína ^c	11,83	57,88
Lipídios ^c	20,21	0,95
Cinzas ^c	0,78	34,25

^aValores são médias das análises em quintuplicata

^bValores incluindo 5 % de maltodextrina usada na secagem do hidrolisado ao valor das cinzas. Média das análises em duplicata

^cValores em base úmida.

O rendimento médio do produto atomizado ficou em torno de 13,7 %.

O baixo rendimento pode ser devido às perdas do produto na câmara de secagem, onde a maior parte do material ficou impregnada. As características finais do hidrolisado consistiam de um leve odor de frango, cor marrom clara e alta higroscopicidade.

O processo de secagem por atomização é empregado por várias razões, porém, pode causar alguma redução na qualidade do produto final. Hamid et al. (2002) estudando a qualidade nutricional de uma proteína hidrolisada de Tilapia, utilizaram duas temperaturas de secagem : 150 °C/76 °C e 180°C/90 °C (entrada/saída). Os autores verificaram que a maior temperatura usada ocasionou decréscimo no conteúdo de todos os aminoácidos analisados; lisina e treonina tiveram decréscimos de 62,2% e 56,3%, respectivamente, havendo também diminuição na quantidade de proteína. Estes mesmos autores, obtiveram rendimentos de secagem inferiores (9,6 %) aos encontrados com a CMSF.

4.6 Gel filtração

O perfil molecular do hidrolisado foi investigado usando gel filtração. A separação realizada com a resina Sephadex G 100 revelou que o hidrolisado é composto por seis frações básicas. O peso molecular de um pequeno número de proteínas excedeu 67000 Da (Pico 1, Figura 12), já a maior parte das proteínas ficou concentrada na faixa de peso molecular menor que 21 000 Da (Picos 3, 4, 5 e 6, Figura 12). Este resultado contrasta com os resultados de Surówka e Fik (1992), que encontraram poucas proteínas com este perfil molecular em hidrolisados de cabeças de frango. Os picos 5 e 6 sugerem a presença de pequenos peptídeos e aminoácidos.

A gel filtração em Sephadex G 25 indicou a presença de proteínas pequenas e peptídeos (Picos 2, 3 e 4, Figura 13) e uma fração de aminoácidos (pico 5), confirmando os resultados obtidos em Sephadex G 100. As Figuras 12 e 13 mostram o perfil molecular obtido utilizando a resina Sephadex G 100 e Sephadex G 25, respectivamente.

A habilidade das enzimas de hidrolisar um substrato protéico é altamente variável. A enzima usada é um fator importante para obter um determinado perfil molecular. Alcalase é uma endopeptidase que cliva as ligações peptídicas no interior da cadeia polipeptídica. Esta enzima é bastante utilizada para produção de peptídeos sem amargor (Clemente, 2000).

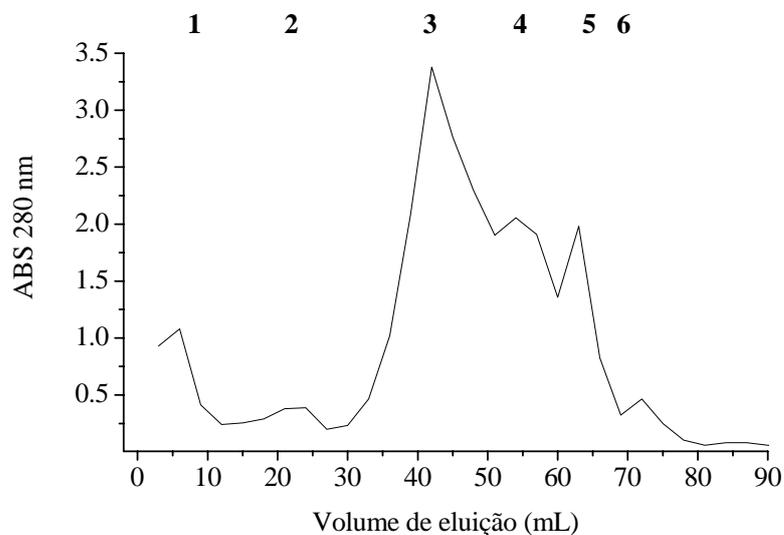


Figura 12 : Gel filtração do hidrolisado em Sephadex G 100. Os Picos 1, 3, 4, 5 e 6 referem-se aos pesos moleculares dos padrões BSA (67 000 Da), Ovoalbumina, (45000 Da); Inibidor de Tripsina, (21000 Da); Citocromo C, (12000 Da) e Triptofano, (204 Da), respectivamente.

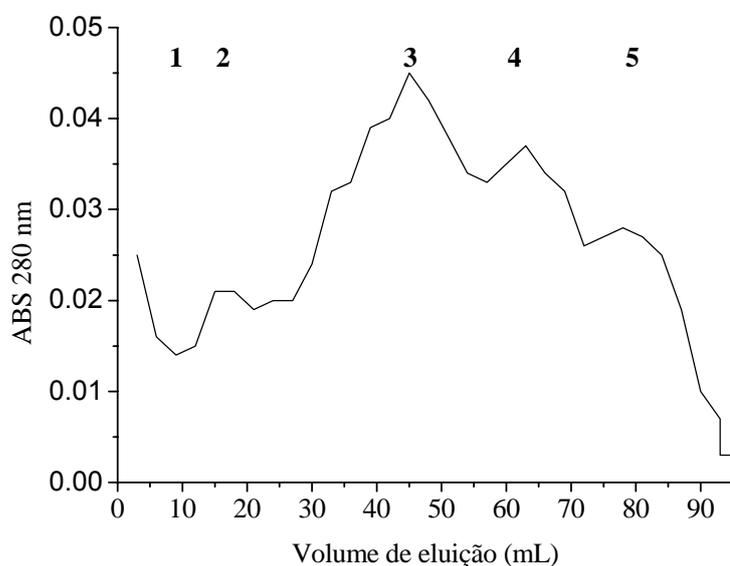


Figura 13: Gel filtração do hidrolisado em Sephadex G 25. Os Picos 1, 3, 4 e 5 referem-se aos padrões Inibidor de Tripsina, (21000 Da); Citocromo C, (12000 Da), Insulina humana (5807 Da) e Triptofano (204 Da), respectivamente.

Sales et al. (1991), utilizando resíduos de carne mecanicamente separada de frango obtiveram um perfil molecular variando de 65 000 a 2400 Da, com a enzima Alcalase. Hoyle & Merritt (1994), utilizando Alcalase sobre hidrolisado de atum fresco, obtiveram uma fração de 30 000 Da, duas frações menores variando de 400 a 1000 Da e uma pequena fração menor que 200 Da. Estes resultados são similares aos encontrados neste trabalho.

O perfil molecular obtido indica que o produto pode ser caracterizado como parcialmente hidrolisado e ser utilizado como fonte de nitrogênio em produtos especializados para adultos e como suplementação protéica. Estes hidrolisados são geralmente caracterizados por uma ampla distribuição de peso molecular, consistindo de uma pequena fração de aminoácidos e pequenos peptídeos, um amplo espectro de peptídeos médios e uma fração de materiais com alto peso molecular (Mahmoud, 1994).

4.7 Qualidade nutricional do hidrolisado

A Tabela 12 apresenta os parâmetros calculados utilizando as proteínas padrão (caseína), teste (proteína hidrolisada) e o grupo aprotéico no ensaio biológico. A análise estatística está representada no Apêndice 5.

Ratos alimentados com caseína tiveram o maior consumo de alimento e maior conteúdo de proteína ingerida. Em relação à utilização de alimento e de proteína a dieta padrão também obteve melhor resultado quando comparada com a proteína hidrolisada. O ganho de peso dos animais alimentados com proteína hidrolisada obteve resultado maior quando comparada com a proteína padrão. Todos os parâmetros acima citados não tiveram diferença significativa.

Tabela 12: Parâmetros calculados em ensaio biológico.

<i>Parâmetros*</i>	<i>Padrão</i>	<i>Teste</i>	<i>Aprotéico</i>
Alimento ingerido (g)	107,08 ± 19,38	100,96 ± 21,48	37,12 ± 11,38
Proteína ingerida (g)	12,48 ± 2,26	10,97 ± 2,33	-
Ganho de peso (g)	34,47 ± 9,45	35,46 ± 15,82	-5,62 ± 1,69
Eficiência de alimento	0,32 ± 0,48	0,35 ± 0,67	-0,151 ± 0,13
Utilização de alimento	3,11 ± 2,05	2,85 ± 1,49	-6,60 ± 7,36
Utilização de proteína	0,36 ± 0,24	0,31 ± 0,14	-
NPR	3,21 ± 4,18	3,74 ± 6,77	-
DV (%)	97,64 ^a ± 0,74	96,43 ^b ± 0,68	-

^{a,b} Valores com diferentes subscritos diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste t. Os demais valores sem subscrito não diferiram significativamente.

* Valores são médias ± desvio padrão de 6 ratos em cada grupo durante 10 dias de experimento.

A digestibilidade é a medida da percentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas na forma de aminoácidos, ou de qualquer outro composto nitrogenado pelo organismo; é um determinante da qualidade protéica da dieta (Monteiro et al., 2004). Os valores de digestibilidade foram menores para a proteína hidrolisada (96,43%) quando comparado com a caseína (97,64%) e diferiram significativamente ao nível de 95 % de confiança ($p < 0,05$). As proteínas de origem animal apresentam digestibilidade elevada, acima de 95% e as de origem vegetal possuem valores bem inferiores, sendo abaixo de 80 % (Sgarbieri, 1996). O Valor encontrado para proteína hidrolisada está de acordo com os encontrados para proteínas de origem animal.

O NPR (Net Protein Ratio), informa sobre a utilidade potencial da proteína para o crescimento e manutenção. O valor encontrado para proteína hidrolisada (3,74) foi superior ao padrão caseína (3,21). Negrão et al. (2005) estudaram a avaliação biológica de farinha de carne mecanicamente separada de frango (CMSF) e farinha de peito de frango (FPF). Os resultados de NPR para CMSF foram 3,19, para FPF 3,68 e para caseína 2,94. Para a digestibilidade os autores encontraram valores de 92,9 % para CMSF, 95,2 % para FPF e 96,3% para caseína. Bhaskar et al. (2007), utilizando vísceras de ovelha obtiveram uma digestibilidade *in vitro* de 74,6%.

Os resultados obtidos neste trabalho são superiores aos encontrados nas literaturas acima citadas. A digestibilidade e NPR tiveram valor alto, quando comparado com Negrão et al. (2005), que utilizaram o mesmo substrato, porém não hidrolisado. A hidrólise da proteína da CMSF pode ter contribuído para o aumento da digestibilidade, pois já estava hidrolisada quando ingerida e a absorção de aminoácidos pelo organismo pode ter sido facilitada.

O perfil de aminoácidos da proteína hidrolisada foi verificado e comparado com a FAO (1985), que estima as necessidades de aminoácidos para crianças e adultos. A Tabela 13 apresenta a composição de aminoácidos e os valores da digestibilidade corrigida pelo escore de aminoácidos (PDCAAS) da proteína hidrolisada. O aminograma realizado encontra-se no Apêndice 6.

Tabela 13: Composição de aminoácidos essenciais e valores de PDCAAS para a proteína hidrolisada.

<i>Aminoácidos</i>	<i>Proteína Hidrolisada</i> (mg/g proteína)	<i>FAO</i> (2-5 anos)	<i>FAO</i> (adultos)	<i>PDCAAS</i>
<i>Essenciais</i>				
Histidina	24	19	16	1,218
Isoleucina	34	28	13	1,171
Leucina	62	66	19	0,906
Lisina	70	58	16	1,164
Metionina+Cistina	15	25	17	0,579*
Phenilalanina+Tirosina	65	63	19	0,995
Treonina	38	34	5	1,078
Triptofano	9	11	9	0,789
Valina	36	35	13	0,992

*aminoácido limitante

O PDCAA de uma proteína é calculado pela comparação do perfil de aminoácidos essenciais do alimento, corrigido pela digestibilidade, com os padrões de referência para crianças de 2-5 anos. A referência de crianças de 2-5 anos é usada porque este é o modelo de maior exigência em aminoácidos. No cálculo de PDCAAS de uma proteína, qualquer valor acima de 1,0 é considerado como 1,0. Não há nenhuma vantagem nutricional no consumo de proteínas com escores maiores, já que o excesso de aminoácidos não é utilizado pelo organismo como aminoácidos; aminoácidos em excesso são deaminados pelo corpo e o nitrogênio é excretado como uréia, enquanto o remanescente da cadeia carbonada pode ser utilizado como energia e armazenado (Henley & Kuster, 1994).

Proteínas com PDCAAS de 1,0 são consideradas proteínas de alta qualidade que suprem os requerimentos de aminoácidos essenciais em humanos. O escore de PDCAAS para algumas proteínas como caseína, clara do ovo e isolado de soja é 1,0, proteína de carne de vaca, 0,92, feijão 0,68 e trigo 0,40.

A proteína hidrolisada apresentou um valor de PDCAA de 0,579, o que pode ser considerado baixo quando comparado com PDCAAS de proteínas de origem animal. Este baixo valor deve-se ao fato de que o conteúdo de metionina e cistina foram inferiores quando comparados com a referência de aminoácidos para crianças de 2-5 anos. Algumas das possíveis causas deste baixo valor em metionina e cistina podem estar relacionadas ao fato de que as proteínas de origem animal, mesmo sendo proteínas de alta qualidade, podem ser limitantes em aminoácidos sulfurados, assim como as proteínas de sementes e leguminosas. Os teores de glicina e prolina encontrados no hidrolisado, indicam que a matéria-prima é composta por uma quantidade significativa de colágeno, sendo este caracterizado pela completa ausência de aminoácidos sulfurados e triptofano. A técnica utilizada para a análise de aminoácidos, segundo Sgarbieri (1996), também pode acarretar a destruição de aminoácidos, como por exemplo, o triptofano que é totalmente destruído durante a hidrólise ácida e a sua quantificação tem que ser realizada por outro método. A perda de cisteína também é grande, sendo em média 20 % ou mais. Outros aminoácidos como a tirosina, prolina, glutamina e aspargina também podem sofrer destruição durante a hidrólise ácida.

Em relação ao perfil de aminoácidos, a proteína hidrolisada apresentou uma boa composição, encontrando valores inferiores para leucina, metionina+cistina e triptofano, quando comparados com a referência para crianças de 2-5 anos. Quando comparados com o padrão para adultos, estes valores foram superiores para quase todos os aminoácidos, sendo exceção apenas metionina+cistina. Negrão et al. (2005), estudando a avaliação biológica de uma farinha de carne mecanicamente separada de frango, encontraram valores de aminoácidos essenciais inferiores ao padrão de referência (FAO, 2-5 anos), com especial atenção à lisina, o qual obteve um valor bem inferior. Hamid et al., (2002) , utilizando Alcalase para produzir um hidrolisado protéico de Tilapia negra (*Oreochromis mossambicus*), obtiveram composição de aminoácidos semelhante à referência (FAO).

Os resultados obtidos no ensaio biológico, com elevados valores de digestibilidade e NPR contrastam com os valores encontrados no aminograma e com os valores de PDCAAS. Sabe-se que animais usados em ensaios biológicos necessitam de requerimentos maiores de aminoácidos sulfurados, para seu crescimento, quando comparados aos humanos, porém, foram estes aminoácidos que apresentaram os menores valores no aminograma. Com isso, uma nova avaliação dos aminoácidos poderia ser realizada, a fim de confirmar se os valores para metionina e cistina estão realmente baixos e compará-los com os obtidos neste trabalho.

Quase todos os aminoácidos têm certas funções únicas no organismo. Os aminoácidos essenciais como o triptofano, o mais complexo aminoácido, é um precursor da vitamina niacina e do neurotransmissor

serotonina , já a histidina é essencial para a síntese de histamina, que causa a vasodilatação no sistema circulatório. Os aminoácidos não essenciais são igualmente importantes para a estrutura protéica. Estes, também foram analisados e estão representados na Tabela 14.

Tabela 14: Aminoácidos não essenciais da proteína hidrolisada.

<i>Aminoácidos</i>	<i>mg/g proteína</i>
Acido Aspártico	86
Acido Glutâmico	128
Serina	36
Prolina	37
Glicina	48
Alanina	50
Arginina	54

A glutamina, formada a partir do ácido glutâmico e a aspargina, derivada do ácido aspártico, tem um papel importante como reservatório de grupos aminos para diferentes tecidos do organismo. A glicina e serina são aminoácidos neuroprotetores, a prolina desempenha papel predominante na formação do tecido conjuntivo e é também substância importante no suprimento da energia muscular , a alanina auxilia a estabilização do açúcar sanguíneo quando o indivíduo está sob estresse ou com hipoglicemia e a arginina promove a secreção dos hormônios prolactina, insulina, hormônio do crescimento, fator de crescimento insulina-símile e fatores de crescimento da pituitária (Oliveira & Marchini, 1998; Waitzberg, 2001; Mahan, 2002). Os

valores encontrados são similares aos reportados por Hamid et al. (2002) e superiores aos encontrados por Nilsang et al. (2005).

5 CONCLUSÕES

Os resultados das pesquisas com as linhagens de BL indicaram que a cepa de *B. circulans* BL 53 obteve uma atividade enzimática superior a cepa BL 13. Porém, as enzimas comerciais possuem uma atividade proteolítica bem maior, já que são produzidas com microrganismos reconhecidamente produtores de proteases.

O planejamento experimental indicou condições ótimas de trabalho para ambas as enzimas, obtendo faixas de trabalho de acordo com a literatura e com o fabricante. As curvas de hidrólise mostraram rápida solubilização protéica, sendo que a solubilização diminuiu gradativamente e ao final de 2 horas, não havendo hidrólise aparente.

O hidrolisado obtido indicou alto conteúdo protéico e boa qualidade microbiológica. De acordo com o perfil molecular, o hidrolisado pode ser caracterizado como parcialmente hidrolisado e ser utilizado como suplementação protéica em dietas e em formulações industriais.

Os resultados da avaliação biológica do hidrolisado estão de acordo com o esperado para uma proteína animal, que possui elevada digestibilidade e NPR, porém contrastam com os baixos valores de metionina e cistina apresentados na análise de aminoácidos e com os PDCAAS, já que os ratos necessitam de maiores requerimentos de aminoácidos sulfurados para seu crescimento.

6 PERSPECTIVAS

Como os trabalhos com as cepas de *Bacillus sp.* BL 13 e *Bacillus circulans* BL 53 foram preliminares no estudo da produção de protease, recomenda-se estudos posteriores para verificar as melhores condições de produção de protease e também selecionar uma cepa produtora e seguir com a etapa de purificação.

A hidrólise enzimática mostrou ser um eficiente processo de obtenção de proteína hidrolisada a partir de uma matéria-prima de baixo valor agregado. Com isso, sugerem-se algumas linhas de interesse para trabalhos futuros:

Determinar o grau de hidrólise durante o processo de proteólise através de técnicas descritas na literatura, como: TNBS e controle de pH durante a hidrólise.

Utilizar a técnica de ultrafiltração em membrana, a fim de verificar se a passagem por membranas retém peptídeos relacionados ao amargor, fazendo então uma comparação com o hidrolisado obtido neste trabalho. Posteriormente, uma avaliação sensorial poderá ser feita para auxiliar na verificação do amargor do produto.

Estudar as propriedades funcionais como: formação de emulsão, índice de solubilidade, formação de espuma, viscosidade e capacidade de retenção de água. Estas características são necessárias quando este tipo de produto é utilizado na indústria de alimentos.

Estudos de otimização das condições de secagem também podem ser realizados, pois altas temperaturas de secagem podem causar a perda de aminoácidos diminuindo assim o valor nutricional. Formulações do produto também podem ser estudadas com o objetivo de verificar em que tipo de dieta este produto poderia ser utilizado, de acordo com suas características.

Uma nova análise de aminoácidos poderia ser realizada a fim de verificar se os valores encontrados realmente são baixos para metionina e cistina quando comparados com os resultados obtidos neste trabalho.

Por fim, pode-se medir a osmolaridade do hidrolisado produzido, já que fórmulas com elevada osmolaridade podem causar diarreias severas quando ministradas a pacientes com problemas digestivos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN, J. Enzymatic hydrolysis of food proteins. **Process Biochemistry**, Watford, v. 12, n.6, p.18-23, 1977.

ADLER-NISSEN, J. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.24, n.6, p.1090-1093, 1976.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 10 de janeiro de 2001.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITARIA. Resolução RDC nº.63, de 06 de julho de 2000. Regulamento técnico para terapia de nutrição enteral. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 29 de abril de 2000.

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

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 15° ed. Washington, D.C, 1990.

AOAC. **Official methods of the association of official analytical chemists**. Arlington, 1995. seq.4.5.0.1.

BAS, D.; BOYACI, I. Modeling and optimization: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, Westport, v.78, p.836-845, 2007.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Food Chemistry**. 3 rd ed. Berlin: Springer, 2004. 1070 p.

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**, Barking, v. 98, p.388-394, 2007.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Química do processamento de alimentos**. 2. ed., São Paulo: Varela, 1995. p.151.

BRANCO, F. R.; SILVA, P. L.; ALVES, N. F. Pesquisa de *Salmonella* sp através de provas de triagem rápida e convencional, em carcaças de frangos abatidos no município de Uberlândia, MG. **Higiene alimentar**, São Paulo, v.16, n. 92/93, p.36-40, jan./fev, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Coordenação Geral de Laboratório Animal. **Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos**. Brasília, 1992. 133 p.

BRASIL. Instrução normativa 4, Anexo 1. Secretaria da defesa agropecuária. Regulamento técnico para fixação da identidade e qualidade de carne mecanicamente separada (CMS) de aves, bovinos e suínos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 05 abril. 2000. p.6-7.

BRASIL. Portaria n. 451 de 19 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico e princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, n.182, p.21005-21012, 22 de setembro de 1997, Seção 1.

CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M.; KANASHIRO, A.M.I. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos derivados de frango. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.67, n.01, jan/jun, 2000.

CASTRO I. A; TIRAPEGUI, J; SILVA, S. F. Protein Mixtures and Their Nutritional Properties Optimized by Response Surface Methodology, **Nutrition Research**, Tarrytown, v.20, n.9, p.1341-1353, 2000.

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

CORDLE, C. T. Control of Food Allergies Using Protein Hydrolysates. **Food Technology**, Chicago, v.48, n.10, p.72-76, 1994.

DINIZ, F. M.; MARTIN, A. M. Influence of process variables on the hydrolysis of shark muscle protein. **Food Science and Technology International**, Oxford, v.4, p.91-98, 1998.

EREN, I.; KAYAMAK-ERTEKIN, F. Optimization of osmotic dehydration of potato using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, Westport, v.79, p.344-352, 2007.

FAO/WHO. **Report of joint FAO/WHO/UNU Expert consultation**. Energy and protein requirements. World Health Organization technical report series, n.724, Geneva, 1985. 258 p.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza (España):Acribia , 2000.1258p.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, V.; TAPIADOR, J.; MARTÍN, A.; LUQUE, de CASTRO, M. D. Optimization of the drying step for preparing a new commercial powdered soup. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, London, v.5, p.361-368, 2004.

FITZGERALD, R. J; O'CUINN, G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.24, p.234-237, 2006.

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

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo:Atheneu, 1996. 182 p.

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

FRONING, G. W. Mechanical Deboned of poultry and fish. **Advances in Food Research**, New York, v.27, p. 109-147, 1981.

GIESE, J. Proteins as ingredients: types, functions, applications. **Food Technology**, Chicago, v.48, n.10, p.50-60, 1994.

HAMID, A. A; BAKAR, J.; BEE, G. H. Nutritional Quality of spray Drier Protein Hydrolysate from Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Food Chemistry**, London, v.78, p.69-74, 2002.

HENLEY, E. C.; KUSTER, J. M. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring, **Food Technology**, Chicago, v.48, n.4, p.74-77, 1994.

HERNÁNDEZ, T.; HERNÁNDEZ, A.; MARTÍNEZ, C. Calidad de proteínas. Conceptos y evaluación. **Alimentaria: Revista de Tecnología de Higiene de los Alimentos**, Madrid, n.274, p.28-37, 1996.

HOFFMANN, F. L.; MANSOR, A. P.; COELHO, A. R.; VINTURIM, T. M. Microbiologia de carcaças e carnes mecanicamente separadas (CMS), obtidas em abatedouro de aves da região de São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.92/93, p.45-50, 2002.

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3.ed. São Paulo: O Instituto, 1985. 533 pg.

KILARA, A. Enzyme-modified protein food ingredients. **Process Biochemistry**, Watford, v.20, n.10, p.149-56, 1985.

KINSELLA, J. E. Functional properties in novel proteins. Some methods for improvement. **Chemistry and Industry**, London, v.5, n.3, p.177-182, 1977.

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

LIMA, A. R. C.; BARROS, L. M.; ROSA, M. S.; CARDONHA, A. M. S.; DANTAS, M. A. M. Avaliação Microbiológica de dietas enterais manipuladas em um hospital. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 20, n.1, 2005.

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

MABROUK, S. S. et al. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. **Bioresource Technology**, Barking, v.69, p.155-159, 1999.

MAHAN, L. K; STUMP, S. E. Krause: **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 10. ed. São Paulo: Rocca, 2002.1157p.

MAHMOUD, M. I. Physicochemical and Functional Properties of Protein Hydrolysates in Nutritional Products. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n.10, p.89-95, 1994.

MALDONADO, J.; GIL, A.; NARBONA, E.; MOLINA, J. A. Special formulas in infant nutrition: a review. **Early Human Development**, Amsterdam, V.53, p.S23-S32, 1998.

MONTEIRO, J. B. R.; COSTA, N. M. B.; ESTEVES, E. A.; MILAGRES, K. H.. Avaliação protéica de dois formulados em pó, a base de soja enriquecidos com zinco, selênio e magnésio para utilização em nutrição enteral. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.1, p.006-010, jan.mar, 2004.

MORENO, M. C. M.; CUADRADO, V. F. Enzymic Hydrolysis of vegetables proteins: mechanism and kinetics. **Process Biochemistry**, Watford, v.28, p.481-490, 1993.

MÓRI, C; GARCIA, E.A; ANDRIGHETTO, C; PELÍCIA, K. Carne de Aves Separada Mecanicamente (mechanical separated poultry meat). **Revista Eletrônica de Veterinária REDVET**, v. 7, n. 4, Abril, 2006. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>. Acesso em: 12 jun.2006.

NEGRÃO, C.C.; MIZUBUTTI, Y.; MORITA, M. C.; COLLI, C.; IDA, E. I.; SHIMOKOMAKI, M. Biological evaluation of mechanically deboned chicken meat protein quality. **Food chemistry**, London, v.90, p.579-583, 2005.

NETO, B.B.; SCARMINO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na indústria**. Campinas: Unicamp, 2001. p.401.

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

NOVO NORDISK A/S. **Alcalase Food Grade**, Scandinávia, Enzyme business, Product Sheet, 1996, p.1-4, December.

OLIVEIRA, J. E. D.; MARCHINI, J. S. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998. 403 p.

OSTOVAR, K.; Mac NEIL, J. H.; O'DONNELL, K. Poultry product quality. 5. Microbiological evaluation of mechanically deboned poultry meat. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 36, n.7, p.1005-1007, 1971.

PEDERSEN, B. Removing bitterness from protein hydrolysates. **Food Technology**, Chicago, v.48, n.10, p. 96-98, 1994.

QUAGLIA, G. B.; ORBAN, E. Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysates. **Journal of Food Science**, Chicago, v.55, n.6, p.1571-1573, 1990.

RAO, M.B.; TANSKALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v.62, n.3, p.205-218, 1998.

REBECA, B. D.; PEÑA-VERA, M. T.; DÍAZ-CASTANÉDA, M. Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases; yield and nutritional value. **Journal of Food Science**, Chicago, v.56, n.2, p.309-314, 1991.

REEVES, P. G.; FORREST, H. N.; FAHEY, G. C. J. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, n. 11, p.1939-51, 1993.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos. Uma estratégia seqüencial de planejamento**. 1. ed. Campinas: Casa do pão, 2005. 326 p.

SAHA C. B.; HAYASHI, K. Debittering of protein hydrolysates. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.19, p.355-370, 2001.

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

SARATH, G.; de la MOTTE, R. S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: BEYMON, R.J.; BOND, J. S (Eds.). **Proteolytic enzymes: a practical approach**. Oxford, England: IRL, 1989. 259 p. (Practical approach series).

SCHMIDL, M. K.; TAYLOR, S. L.; NORDLEE, J. A. Use of hydrolysate-based products in special medical diets. **Food Technology**, Chicago, v.48, n.10, p.77-85, 1994.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, 1996. 517p.

SGARBIERI, V.C. **Alimentação e Nutrição**. São Paulo: Almed, 1987. p. 387.

SHAHIDI, F.; HAN, X.Q.; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, London, v.53; p.285-293, 1995.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, São Paulo: Varela, 1997. p.317.

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

SOARES. L.H. **Aproveitamento de carne mecanicamente separada de aves na produção de proteína hidrolisada solúvel utilizando sete enzimas proteolíticas e suas associações**. 1998. 97 f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

SOGI, D. S.; BHATIA, R.; GARG, S.K.; BAWA, A. S. Biological evaluation of tomato waste seed meals and protein concentrate. **Food Chemistry**, London, v. 89, p. 53-56, 2005.

SPARKMAN, D.C.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 30, p. 1190-1206, 1958.

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, p.447-453, 2003.

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

STANLEY, D. W. Non-bitter protein hydrolysates. **Journal of the Canadian Institute Food Science Technology**, Ontario, v.14, n.1, p.49-52, January, 1981.

SURÓWKA, K.; FIK, M. Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. I. An application of neutrase to the production of protein hydrolysate. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 27, p.9-20, 1992.

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

WAITZBERG, D. L. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2001. v.2, p.642.

WEBSTER, J. D.; LEDWARD, D. A.; LAWRIE, R. A. Protein Hydrolysates from Meat industry by-products. **Meat Science**, Barking, v.7, p.147-157, 1982.

XIA, S. H.; WANG, Z.; XU, S. Y. Characteristics of *Bellamya purificata* snail foot protein and enzymatic hydrolysates. **Food chemistry**, London, v.101, p. 1188-1196, 2007.

YANG, J.; SHIH, I.; TZENG, Y.; WANG, S. L. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, Nova York, v.26, p.406-413, 2000.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, São Paulo, v.21, n.6, p.787-793, 1998.

APÊNDICE 1

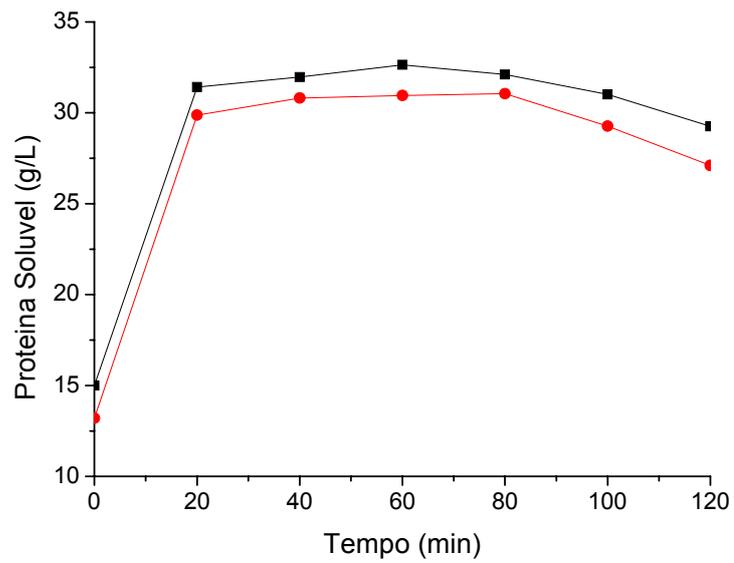


Gráfico de proteína solúvel do hidrolisado produzido com e sem tratamento a 85 °C. Com tratamento (-■-), sem tratamento (-●-).

APÊNDICE 2

Análise estatística utilizando a ANOVA para o planejamento experimental da enzima Alcalase.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>	<i>F calculado</i>	<i>F tabelado</i>
Regressão	0,0488	6	0,0081	8,7776	3,22
Resíduo	0,0092	10	0,0009		
Falta de Ajuste	0,0092	8	0,0011		
Erro Puro	6,6667E-05	2	3,3333E-05	0	
Total	0,0581	16			

% da variação explicada (R^2)=84,0, $F_{10,6,0,05}=3,22$

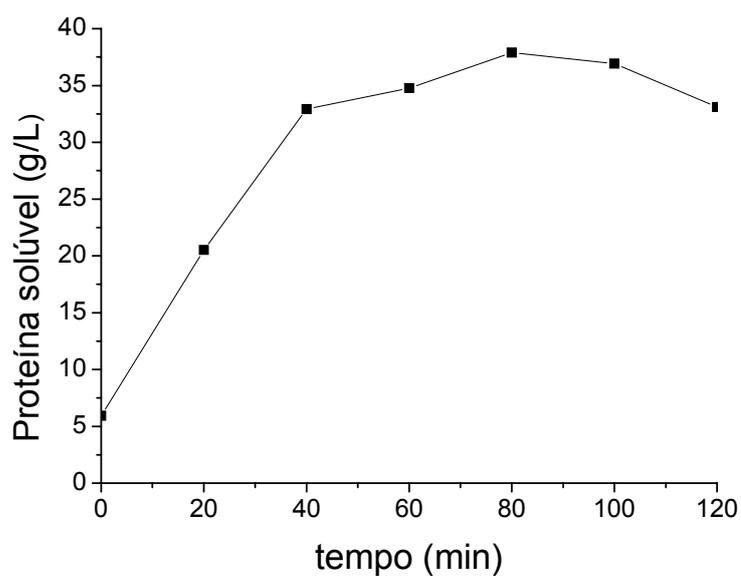
Análise estatística utilizando a ANOVA, para o planejamento experimental da enzima Flavourzyme.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>	<i>F calculado</i>	<i>F tabelado</i>
Regressão	0,01190	6	0,0019	10,4413	3,22
Resíduo	0,00190	10	0,00019		
Falta de Ajuste	0,0018	8	0,0002		
Erro Puro	2,0667E-05	2	1,0333E-05	0	
Total	0,01380	16			

% da variação explicada (R^2)=86,2, $F_{10,6,0,05}=3,22$

APÊNDICE 3

Validação do modelo para a enzima **Alcalase**: Temperatura de 53°C, pH 8,3 e concentração de enzima de 2,6%.



Curva de proteína solúvel (g/L) para Alcalase: Temperatura de 53 °C, pH 8,3 e concentração de enzima de 2,6 %.

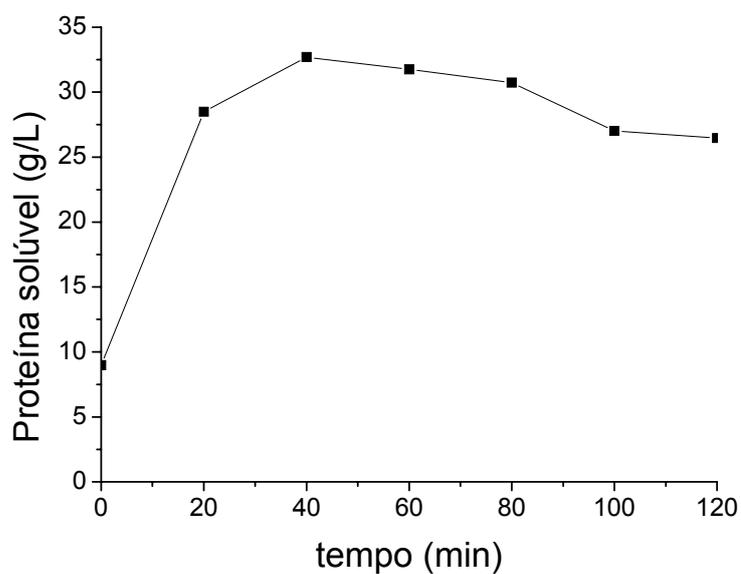
Valor predito pelo modelo para o índice de hidrólise: $IH = 0,760$

Valor experimental do índice de hidrólise para o modelo validado:
 $IH = 0,734$

Então, através de uma regra de 3 simples a diferença entre o valor experimental e o predito foi de 3,5 %.

APÊNDICE 3: Continuação...

Validação do modelo para **Flavourzyme**: T de 58 °C, pH 6,0 e concentração de enzima de 3,0 %.



Curva de proteína solúvel (g/L) para Flavourzyme: Temperatura de 58 °C, pH 6,0 e concentração de enzima de 3,0 %.

Valor predito pelo modelo para o índice de hidrólise: $IH = 0,560$

Valor experimental do índice de hidrólise para o modelo validado:
 $IH = 0,550$

Então, através de uma regra de 3 simples a diferença entre o valor experimental e o predito foi de 1,8 %.

APÊNDICE 4

Otimização da hidrólise enzimática para enzima Flavourzyme. Valores de proteína solúvel e índice de hidrólise (IH), obtidos nos tratamentos realizados (Tabela 7).

<i>Tratamentos</i>	<i>Proteína solúvel (g/L)</i>							
	<i>0 min</i>	<i>20 min</i>	<i>40 min</i>	<i>60 min</i>	<i>80 min</i>	<i>100 min</i>	<i>120 min</i>	<i>IH</i>
1	5,51	20,80	23,55	25,68	27,15	25,64	25,02	0,497
2	5,96	18,97	23,40	27,96	28,24	27,32	28,10	0,512
3	6,53	18,41	23,03	27,18	28,18	27,91	24,15	0,497
4	6,90	19,90	26,82	29,32	29,67	28,53	28,25	0,523
5	5,90	19,33	26,90	27,59	25,80	25,66	24,06	0,498
6	5,22	21,33	28,32	28,54	28,74	28,54	24,89	0,540
7	6,49	22,25	26,30	28,07	28,55	28,50	26,85	0,507
8	7,05	26,11	29,10	30,10	30,96	29,96	29,53	0,549
9	5,94	21,55	23,38	26,67	27,48	28,07	30,02	0,553
10	5,64	20,95	24,73	25,75	27,37	29,69	28,18	0,552
11	6,46	20,90	24,41	25,21	28,07	30,28	28,88	0,547
12	6,02	20,57	24,71	25,61	25,66	26,30	25,46	0,466
13	6,93	23,97	26,89	30,24	29,24	29,38	28,81	0,539
14	6,93	19,97	28,39	28,60	29,10	28,10	27,17	0,509
15	8,96	23,25	28,74	31,45	30,31	29,31	28,10	0,517
16	6,07	20,90	22,74	23,92	25,65	26,08	24,46	0,460
17	5,71	24,67	26,02	29,10	29,53	29,69	29,42	0,551

APÊNDICE 4: Continuação...

Otimização da hidrólise enzimática para enzima Alcalase. Valores de proteína solúvel e índice de hidrólise (IH) , obtidos nos tratamentos realizados (Tabela 7).

<i>Tratamentos</i>	<i>Proteína solúvel (g/L)</i>							
	<i>0 min</i>	<i>20 min</i>	<i>40 min</i>	<i>60 min</i>	<i>80 min</i>	<i>100 min</i>	<i>120 min</i>	<i>IH</i>
1	8,19	24,78	30,80	32,89	34,66	33,40	33,91	0,608
2	9,34	27,38	37,77	38,27	38,86	39,46	38,68	0,692
3	8,19	25,37	33,68	35,64	36,67	33,83	31,71	0,654
4	9,34	31,63	35,68	40,05	40,37	39,14	38,27	0,713
5	8,19	27,45	33,63	36,15	35,88	35,60	35,21	0,642
6	8,94	30,72	36,82	39,41	40,82	38,77	38,23	0,732
7	8,19	22,57	35,02	36,59	38,01	34,70	33,40	0,685
8	8,94	30,85	39,18	41,74	40,87	40,81	37,95	0,736
9	9,34	29,30	36,27	41,82	40,64	39,36	38,59	0,750
10	9,34	30,99	40,14	42,42	41,69	40,68	40,18	0,760
11	9,34	29,85	39,05	42,14	41,64	39,73	39,55	0,750
12	6,99	23,66	30,44	35,03	35,87	35,73	33,98	0,663
13	10,05	32,77	37,13	39,91	39,73	39,09	39,00	0,686
14	10,05	29,26	38,73	39,78	39,91	40,06	37,86	0,702
15	10,24	31,17	37,18	37,41	41,96	40,59	37,18	0,728
16	9,19	25,94	29,04	30,22	31,86	31,99	27,94	0,520
17	9,19	26,21	35,27	36,13	36,50	37,41	39,28	0,691

APÊNDICE 5

Teste de Student realizado para os parâmetros calculados no ensaio biológico. Quando Stat t for maior que t crítico (bi-caudal) há diferença significativa a 5 %. Quando Stat t for menor que t crítico (bi-caudal) não há diferença significativa a 5%.

Análise estatística para a digestibilidade pelo teste t.

	<i>Proteína padrão</i>	<i>Proteína Teste</i>
Média	97,62667	96,36
Variância	0,562907	0,47124
Observações	6	6
Variância agrupada	0,517073	
Hipótese da diferença de média	0	
Grau de liberdade	10	
<i>Stat t</i>	3,051033	
P(T<=t) uni-caudal	0,006115	
<i>t crítico uni-caudal</i>	1,812462	
P(T<=t) bi-caudal	0,01223	
<i>t crítico bi-caudal</i>	2,228139	

Análise estatística para o ganho de peso pelo teste t.

	<i>Proteína padrão</i>	<i>Proteína Teste</i>
Média	34,47333	35,46667
Variância	89,28563	250,4778
Observações	6	6
Variância agrupada	169,8817	
Hipótese da diferença de média	0	
Grau de liberdade	10	
<i>Stat t</i>	-0,132	
P(T<=t) uni-caudal	0,4488	
<i>t crítico uni-caudal</i>	1,812462	
P(T<=t) bi-caudal	0,8976	
<i>t crítico bi-caudal</i>	2,228139	

APÊNDICE 5: Continuação...

Análise estatística para o consumo de alimento pelo teste t.

	<i>Proteína padrão</i>	<i>Proteína Teste</i>
Média	107,0833	100,9617
Variância	375,6735	461,4151
Observações	6	6
Variância agrupada	418,5443	
Hipótese da diferença de média	0	
Grau de liberdade	10	
Stat t	0,518274	
P(T<=t) uni-caudal	0,30777	
t crítico uni-caudal	1,812462	
P(T<=t) bi-caudal	0,61554	
t crítico bi-caudal	2,228139	

Análise estatística para NPR pelo teste t.

	<i>Proteína padrão</i>	<i>Proteína Teste</i>
Média	3,189167	3,6545
Variância	0,104448	1,777365
Observações	6	6
Variância agrupada	0,940907	
Hipótese da diferença de média	0	
Grau de liberdade	10	
Stat t	-0,83091	
P(T<=t) uni-caudal	0,212711	
t crítico uni-caudal	1,812462	
P(T<=t) bi-caudal	0,61554	
t crítico bi-caudal	2,228139	

APÊNDICE 5: Continuação...

Análise estatística para utilização de proteína pelo teste t.

	<i>Proteína padrão</i>	<i>Proteína Teste</i>
Média	0,37305	0,461417
Variância	0,002831	0,178988
Observações	6	6
Variância agrupada	0,09091	
Hipótese da diferença de média	0	
Grau de liberdade	10	
Stat t	-0,50763	
P(T<=t) uni-caudal	0,311361	
t crítico uni-caudal	1,812462	
P(T<=t) bi-caudal	0,622723	
t crítico bi-caudal	2,228139	

Análise estatística para eficiência de alimento pelo teste t.

	<i>Proteína padrão</i>	<i>Proteína Teste</i>
Média	0,317483	0,336667
Variância	0,001983	0,023547
Observações	6	6
Variância agrupada	0,012765	
Hipótese da diferença de média	0	
Grau de liberdade	10	
Stat t	-0,29409	
P(T<=t) uni-caudal	0,387353	
t crítico uni-caudal	1,812462	
P(T<=t) bi-caudal	0,774706	
t crítico bi-caudal	2,228139	

APÊNDICE 5: Continuação...

Análise estatística para utilização de alimento pelo teste t.

	<i>Proteína padrão</i>	<i>Proteína Teste</i>
Média	3,202583	4,213333
Variância	0,208589	15,25899
Observações	6	6
Variância agrupada	7,733788	
Hipótese da diferença de média	0	
Grau de liberdade	10	
Stat t	-0,62952	
P(T<=t) uni-caudal	0,271562	
t crítico uni-caudal	1,812462	
P(T<=t) bi-caudal	0,543124	
t crítico bi-caudal	2,228139	

Análise estatística para proteína ingerida pelo teste t.

	<i>Proteína padrão</i>	<i>Proteína Teste</i>
Média	12,475	10,97453
Variância	5,10055	5,451949
Observações	6	6
Variância agrupada	5,276249	
Hipótese da diferença de média	0	
Grau de liberdade	10	
Stat t	1,131422	
P(T<=t) uni-caudal	0,14214	
t crítico uni-caudal	1,812462	
P(T<=t) bi-caudal	0,28428	
t crítico bi-caudal	2,228139	

APÉNDICE 6

CURRICULUM VITAE

Nome: Daniele Misturini Rossi

Data de nascimento: 24/12/1979

Naturalidade: Bento Gonçalves, RS.

Filiação: Veranice Jurema Pacheco e Jorge Misturini

Ensino Fundamental: Escola Municipal de 1º Grau Professor Noely Clemente de Rossi, Bento Gonçalves, RS.

Ensino Médio: Escola Estadual de 1º e 2º Graus Mestre Santa Bárbara, Bento Gonçalves, RS.

Ensino Superior: Universidade Federal de Santa Catarina, Curso de Engenharia de Alimentos, Florianópolis, SC.

Resumos Publicados:

VII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, Enzitec. Participação com publicação de resumo. Assunto: Utilização de carne mecanicamente separada para a produção de um hidrolisado protéico a partir de enzimas microbianas, 2006.

XVIII Salão de Iniciação Científica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Participação com publicação de resumo. Assunto: Utilização de carne mecanicamente separada para a produção de um hidrolisado protéico a partir de enzimas microbianas, 2006.

XV Congresso de Iniciação científica e VIII Encontro de Pós-graduação, UFPEL. Participação com publicação de resumo. Assunto: Utilização de carne mecanicamente separada para a produção de um hidrolisado protéico a partir de enzimas microbianas, 2006.

XV Congresso de Iniciação científica e VIII Encontro de Pós-graduação, UFPEL. Participação com publicação de resumo. Assunto: Avaliação biológica de um hidrolisado protéico obtido a partir de carne mecanicamente separada de frango, 2006.

Formação complementar:

Implantação do Sistema de Análise de Perigos. (Carga horária: 28h) Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial, SENAI, Rio de Janeiro, Brasil, 2003.

Curso de Planejamento Experimental e Otimização de Processos. Departamento de Ciência dos Alimentos/ Instituto de ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.