UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

HIDROLISADOS DE CARNE BOVINA - biotecnologia de obtenção -

MARICÊ NOGUEIRA DE OLIVEIRA STABILE

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Renato Baruffaldi.

SÃO PAULO
1989

Para ser grande, sê inteiro. Nada

Teu exagera ou exclue.

Sê todo em cada coisa. Põe quanto és

No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda

Brilha, porque alta vive.

Fernando Pessoa

Reproduzida em: 20/08/89

Aos meus queridos pais Alvaro e
Maria Cecilia e ao meu marido
Ronaldo pela paciência, compreensão
e amor.

Ao Prof. Dr. Renato Baruffaldi pela
orientação, dedicação e incentivo,
especiais agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Baruffaldi e ao Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli pela oportunidade de ingresso na carreira universitária.

Ao Prof. José Abrahão Neto pelo primeiro contato com a parte experimental.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio concedido.

Ao Centro Interdepartamental de Química das Proteínas (CIQP) da Faculdade de Medicina-USP, campus de Ribeirão Preto, na pessoa do Prof. Dr. Lewis Green, pelas análises de perfil de aminoácidos.

Ao Prof. Dr. Mario Hirata, a Profa. Rosário Domingues Hirata e ao técnico Ricardo Omoto, pelo auxílio no desenvolvimento das análises por eletroforese.

Ao Prof. Dr. Robert Wasycky e ao Prof. Antonio Altair Magalhães de Oliveira pela cessão dos microscópios para as fotomicrografias.

Aos colegas professores do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP pelo desafio e sugestões.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP pela presença nos momentos necessários.

A Vilma Cherutti pela revisão do texto.

A bibliotecária Moema R. dos Santos pela colaboração nos trabalhos de revisão bibliográfica.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, pelo apoio, consideração e amizade.

A Deus pela força interior sem a qual seria impossível chegar até aqui.

SUMMARY

The protein hydrolyzates production has three different aims: to modify the functional properties of the proteins; the preparation of small peptides or amino acids for its use in dietetic foods or with special purposes and, also as flavoring agents.

The objectives of the research consist in establishing the processing conditions in order to obtain the meat protein hydrolyzates: the study of the enzymatic action of papain, trypsin and of microbial protease, separated or in a blend; determination of the solubilized material; the degree of hydrolysis in previously established conditions, and of some functional properties such as viscosity and emulsifying capacity and, finally the identification and characterization of the resulting substances from the hydrolysis. The purpose of the study is the development of a product to be used in enteral nutrition.

The cut of meat locally called "patinho" was subject to previous handling in order to eliminate visible fat and aponeurosis, and ground. The papain, the trypsin and the microbial protease were used, separated or in a blend, previously subject to the determination of its activity. A 10 % protein solution was prepared with pH = 7.0, then heated at 50 - 60 °C and when the temperature was leveled, the enzymes were added to a proportion of 1:100 of protein. Then we proceeded to the

hydrolysis under agitation for 3 hours. After thermic inactivation and filtration, the soluble solids concentration was determined, the molecular weight of the soluble peptides was estimated, then fractioning through thin layer chromatography and the amino acids quantity analysis. Viscosity measurement and fluid characterization were also established. The dry hydrolyzate product was stored in plastic bags and was analysed according to chemical composition and emulsifying capacity of its protein.

The effect of the enzyme action on the bovine meat protein was observed in sequence : blending of enzymes, followed by papain and trypsin and finally of the microbial protease according to solubility and degree of hydrolysis.

After 120 minutes of hydrolysis under experimental conditions, the Brix degrees, soluble solids and degree of hydrolysis remained unchanged.

In the angular velocity range tested the protein hydrolyzate presented a non-Newtonian, pseudoplastic behavior. The viscosity of the hydrolyzate is 1,7 - 36,0 poise at 30 °C and 2,4 - 52,7 poise at 60 °C. The maximum values of viscosity were reached at 90 minutes of hydrolysis.

The increase of soluble protein concentration, increases the emulsifying capacity of soybean oil in water, bringing on a lowering of fat globules diameter.

The treatment with the enzyme blend promotes an enrichment of the soluble in essential amino acids. The opposite occurs with papain.

The amount of free amino acids existing in meat is low. After only 30 minutes of enzymatic treatment the amount increases 5.7 times on average. During the hydrolysis the concentration of free amino acids grows.

The most commonly found amino acids in all treatments was arginine. The tryptophan was found among the free and the phenylalanin amounts were always bellow the FAO's proposed parameters.

The electrophoretic analysis revealed the progress of hydrolysis, showing the different bands of molecular weights smaller every time.

The hydrolyzate is a product of high soluble oligopeptides and free amino acids, free of microbiological contamination.

During the hydrolytic process, there is a constant variation in characteristics of the soluble and its amino acidic composition.

RESUMO

A produção de hidrolisados protéicos visam três propósitos distintos : modificar as propriedades funcionais das proteínas; preparação de pequenos peptídeos ou aminoácidos para uso em dietéticos ou com finalidades especiais e, ainda, como agentes flavorizantes.

Os objetivos da pesquisa consistiram em estabelecer as condições de processamento para obtenção de hidrolisados protéicos de carne bovina : estudo da ação enzimática da papaína, da tripsina e da protease microbiana, isoladas e em mistura; determinação do material solubilizado; do grau de hidrólise nas condições pré-estabelecidas e, de algumas propriedades funcionais como viscosidade e capacidade de emulsificação e, ainda, identificação e caracterização das substâncias resultantes da hidrólise. A finalidade do estudo é a elaboração de um preparado formulado para utilização em alimentação enteral.

A porção da carne conhecida no mercado pelo nome de "patinho" foi submetida a tratamento prévio para retirada de gordura visível e aponevroses e, moída. Utilizou-se a papaína, a tripsina e a protease microbiana, isoladas e em mistura (papaína : tripsina : protease microbiana, 2:1:2), previamente submetidas a determinação de atividade. Preparou-se uma suspensão a 10 % de proteína e a valor de pH = 7,0, aqueceu-se a 50-60 °C e após a estabilização da temperatura, acrescentou-se as enzimas na proporção 1:100 de proteína.

O tratamento com a mistura de enzimas promove enriquecimento do solúvel em aminoácidos essenciais. Com a papaína ocorre o inverso.

O teor de aminoácidos livres existentes na carne é baixo. Em apenas 30 minutos de tratamento enzimático na média a concentração eleva-se em 5,7 vezes. Durante a hidrólise ocorre um aumento na concentração de aminoácidos livres.

O aminoácido liberado em maior teor em todos tratamentos foi a arginina. O triptofano foi detectado entre os livres e os teores de fenilalanina sempre estiveram abaixo do valor proposto pela FAO.

As análises eletroforéticas revelaram a progressão da hidrólise mostrando as diferentes manchas de pesos moleculares cada vez menores.

O hidrolisado é um produto de alto teor de oligopeptídeos solúveis e de aminoácidos livres, isento de contaminação microbiana.

Durante o transcorrer do processo hidrolítico há uma variação constante nas características do solúvel e na sua composição aminoacídica.

Procedeu-se à hidrólise sob agitação durante 3 horas. Após inativação térmica e filtração determinou-se a concentração de sólidos solúveis; a avaliação do peso molecular dos peptídeos solúveis; o fracionamento por cromatografia em camada delgada e, a análise quantitativa dos aminoácidos. Ainda foram feitas medidas de viscosidade e caracterização do fluido. O produto hidrolisado seco, acondicionado em sacos plásticos, foi analisado com relação a composição química, capacidade de emulsificação de sua proteína e perfil de aminoácidos.

A eficiência do ataque das enzimas sobre as proteínas da carne bovina deu-se na seguinte ordem: mistura de enzimas, seguida da papaína e da tripsina e finalmente da protease microbiana segundo os parâmetros solubilidade e grau de hidólise.

Passados 120 minutos de hidrólise nas condições de trabalho os valores de graus Brix, sólidos solúveis e grau de hidrólise mantiveram-se inalterados.

Na faixa de velocidades angulares ensaiadas o hidrolisado protéico comportou-se como um fluido não-Newtoniano, pseudoplástico. A viscosidade do hidrolisado é de 1,7 a 36,0 poise a 30 °C e 2,4 a 52,7 poise a 60 °C. Os valores máximos para a viscosidade são alcançados aos 90 minutos de hidrólise.

Conforme cresce a concentração de proteína solúvel, aumenta a capacidade de emulsificação de óleo de soja em água, acarretando uma diminuição do diâmetro dos glóbulos de gordura.

INDICE

	página
I - INTRODUÇÃO	1
1 - Generalidades.....	1
1.1. - Proteínas do músculo.....	4
1.1.1. - Proteínas sarcoplasmáticas.....	5
1.1.2. - Proteínas miofibrilares.....	5
1.1.3. - Proteínas do tecido conjuntivo.....	8
1.2. - As enzimas proteolíticas.....	10
1.3. - A hidrólise enzimática das proteínas...	14
1.4. - Revisão da literatura.....	16
1.5. - Alimentação enteral.....	26
II - OBJETIVOS.....	30
III - MATERIAIS.....	31
1. - Matéria-prima.....	31
2. - Enzimas.....	31
3. - Equipamentos de laboratório.....	31
4. - Reagentes analíticos.....	33
5. - Soluções reagentes.....	34

IV	-	METODOS.....	43
1.	-	Medida da atividade enzimática.....	43
2.	-	Determinação da concentração de sólidos solúveis.....	44
3.	-	Grau de hidrólise.....	47
4.	-	Medidas da viscosidade.....	47
5.	-	Capacidade de emulsificação.....	48
6.	-	Fracionamento e identificação de aminoácidos.....	49
7.	-	Aminogramas.....	49
8.	-	Eletroforese em gel de acrilamida.....	50
9.	-	Composição centesimal.....	52
9.1.	-	Umidade e voláteis a 105 °C.....	52
9.2.	-	Teor de nitrogênio.....	52
9.3.	-	Determinação da fração extrato etéreo.....	52
9.4.	-	Resíduo mineral fixo.....	52
10.	-	Controle microbiológico.....	53
V	-	PARTE EXPERIMENTAL.....	54
VI	-	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
1.	-	Medida da atividade enzimática.....	57
2.	-	Solubilidade e grau de hidrólise.....	62

3.	-	Medidas da viscosidade.....	75
4.	-	Capacidade de emulsificação.....	88
5.	-	Fracionamento e identificação de aminoácidos.....	113
6.	-	Aminogramas.....	115
7.	-	Eletroforese em gel de acrilamida.....	138
8.	-	Composição centesimal.....	147
9.	-	Controle microbiológico.....	148
VII -		CONCLUSOES.....	149
VIII-		REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	151

I - INTRODUÇÃO

1 - GENERALIDADES

As proteínas são substâncias complexas presentes em todos os tipos de matéria viva: plantas, animais e microrganismos. O nome proteína, de origem grega, significando "de primeira importância", foi sugerido por Berzelius e primeiramente utilizado por Mulder em 1834. No corpo humano as proteínas constituem o mais importante elemento estrutural, sendo encontradas nos músculos, na pele, nos cabelos, no tecido conjuntivo, etc. Enzimas e hormônios são proteínas, assim como a maior parte das informações genéticas são por elas expressas (15, 25, 49, 62, 67, 95, 100, 102).

Em sua maioria, constituem-se no mínimo de hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Quase todas contêm enxofre e algumas contêm elementos adicionais como fósforo, ferro, zinco e cobre. A presença do nitrogênio é uma característica importante, pois dá às proteínas muitas de suas propriedades peculiares (62, 95, 102).

Apesar de sua complexidade e diversidade, todas as proteínas consistem de 20 unidades estruturais denominadas aminoácidos. Nas moléculas protéicas, os aminoácidos estão unidos covalentemente por ligações peptídicas, isto é, o grupo carboxila de um aminoácido liga-se com o amino grupo do

segundo aminoácido liberando água (49, 62, 95, 102).

As cadeias polipeptídicas podem conter centenas de aminoácidos residuais, apresentando peso molecular, composição química, ordem sequencial e disposição espacial definidos. Quando hidrolisadas por ácidos minerais fortes ou certas enzimas, as proteínas são decompostas em aminoácidos (49, 62, 67, 95, 102).

As moléculas protéicas possuem diversos tipos e graus de organização molecular. O termo estrutura primária refere-se ao esqueleto covalente da cadeia polipeptídica e à sequência de seus aminoácidos unitários. A estrutura secundária corresponde ao arranjo regular, repetitivo no espaço, da cadeia polipeptídica ao longo de uma dimensão, formando hélices e folhas pregueadas (15, 62, 95, 100).

As proteínas podem adquirir formas globulares e enoveladas compactas. A maneira pela qual a cadeia encurva-se e dobra-se em três dimensões, denomina-se estrutura terciária. Já o termo referente à quaternária indica a forma pela qual as cadeias polipeptídicas individuais, de uma proteína estão dispostas em relação às outras (15, 25, 49, 62, 95).

Cada molécula protéica tem em seu estado nativo uma configuração tridimensional peculiar, designada conformação, que corresponde à combinação das estruturas secundária, terciária e quaternária das proteínas (15, 49, 62, 95, 100).

As proteínas exercem funções fundamentais e importantes no organismo e certos aminoácidos só podem ser obtidos através

da ingestão dietária. São denominados aminoácidos essenciais: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, valina, triptofano e treonina . A histidina é considerada essencial para crianças. O conhecimento da qualidade e quantidade das proteínas na dieta, suas fontes alimentares e seu metabolismo é por demais significativo (58).

São denominadas proteínas completas, as moléculas nas quais estão presentes todos os aminoácidos essenciais em quantidade suficiente e na proporção correta para manter o equilíbrio de nitrogênio e promover o crescimento. São elas a ovoalbumina e a caseína, principais proteínas do ovo e do leite, respectivamente, e também as proteínas da carne, dos pescados e das aves (58) .

Os alimentos protéicos de fonte animal possuem proteínas de alto valor biológico, isto é, proteínas portadoras de alto teor de aminoácidos essenciais, além de serem facilmente absorvidas pelo organismo (58).

Segundo a Food and Nutrition Board (30), as necessidades diárias recomendadas de proteínas para um homem referência de 70 kg e uma mulher referência de 58 kg é de 0,8 g de proteína por kg de peso corpóreo por dia. Isso equivale a 56 g e 46 g por dia para o homem e a mulher, respectivamente.

Considerando uma ingestão calórica adequada, as necessidades de proteína para manter o balanço de nitrogênio foram determinadas em 47 g/kg de peso corpóreo. Para crianças, gestantes e lactentes, são feitas recomendações adicionais em

função do crescimento, do desenvolvimento fetal e da produção de leite. O Joint Committee da FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION (104) também exprimiu as necessidades de proteínas, definindo o "nível seguro" de ingestão de proteínas da mais alta qualidade (ovo ou leite) como sendo 52 a 57 g/kg peso corpóreo/dia para um adulto (104).

1.1 - As proteínas do músculo

O músculo é formado por fibras; tecido conjuntivo circundando as fibras; os vasos sanguíneos e nervos; o tecido lipídico e a mioglobina, responsável pela coloração vermelha e pela reserva de oxigênio. Contém 75 % de água; 20 % de proteínas; 3 % de lipídeos, dos quais 0,3 a 1 % são fosfolipídeos; 1,2 % de glicídeos; 0,7 % de sais minerais, dos quais 38 % são ions de potássio intracelulares e 7 % são ions sódio extracelulares (7, 16, 20, 21, 34, 50, 60, 61).

As proteínas do músculo podem ser divididas em 3 grupos, as sarcoplasmáticas, solúveis em soluções salinas de baixa força iônica (menor ou igual a 0,1); as miofibrilares ou proteínas estruturais, solúveis em soluções salinas concentradas (força iônica 0,5 a 0,6); e as proteínas do tecido conjuntivo, insolúveis em ambas as soluções, pelo menos a baixas temperaturas (34, 60).

1.1.1- Proteínas sarcoplasmáticas

A carne quando homogeneizada em soluções salinas de baixa força iônica fornece, após centrifugação a baixa velocidade, um sobrenadante denominado sarcoplasma. Após centrifugação a altas velocidades, removem-se corpos estruturais do líquido, resultando um sobrenadante contendo as proteínas sarcoplasmáticas globulares reais (34, 60).

As proteínas sarcoplasmáticas perfazem 30 % do total das proteínas do músculo. São solúveis em soluções de baixa concentração salina, mas insolúveis em água quente. Compreendem as albuminas, solúveis em água, e a mioglobina, também denominada fração miogênica, as quais pertencem à maioria das enzimas envolvidas na glicólise (7, 34, 60).

1.1.2- Proteínas miofibrilares

Miosina

A miosina perfaz 35 % da proteína do músculo, é a mais abundante de todas as proteínas encontradas na carne. É uma molécula com alta relação comprimento/diâmetro e de peso molecular 510.000. É formada por duas cadeias denominadas meromiosina pesada e meromiosina leve. A miosina contém grande quantidade de unidades de ácidos aspártico e glutâmico e unidades básicas de histidina, lisina e arginina. Da composição aminoacídica pode-se esperar que a miosina apresente-se carregada

negativamente em valor de pH fisiológico. Isto é confirmado por investigações químicas e físicas; o ponto isoelétrico da miosina é aproximadamente 5,4 em solução de cloreto de potássio (7, 16, 20, 21, 60, 61).

Uma propriedade importante da miosina é sua atividade adenosina-trifosfatase (ATP-ase), envolvida com a contração muscular. A miosina demonstra afinidade por cátions monovalentes, como sódio e potássio. A grande parte da molécula de miosina possui configuração de α -hélice, sendo que a meromiosina pesada perfaz 100 % de estrutura espiral (34).

Actina

A actina representa 15 % da proteína total do músculo, também pertencendo ao conjunto das proteínas contrácteis. Existe sob duas formas; quando ligada ao ATP está sob a forma globular denominada G-actina. É obtida do tecido muscular por extração com água e apresenta um peso molecular de 60.000 (16, 20, 21, 34).

Sob a influência de sais neutros, a G-actina polimeriza para a forma fibrosa, a F-actina, com fissão simultânea do ATP em ADP e monofosfato. Embora a actina apresente fraca atividade ATP-ase, o complexo com ATP não demonstra ser indispensável para a polimerização até F-actina. A proteína não possui peso molecular definido, considerando o fato de os filamentos da actina não serem de comprimento conhecido (7, 21, 34).

Actinmiosina

No músculo, a miosina e a F-actina estão presentes sob a forma complexada de actinmiosina, correspondendo a uma forma estrutural responsável pela contração e relaxamento no músculo do animal vivo. O ATP tem uma influência distinta na actinmiosina. Uma solução de actina preparada pela mistura de soluções puras de actina e de miosina, mostra alta viscosidade. Essa diminui quando são adicionados ATP e seu sal de magnésio, pois ocorre a reação de dissociação entre a actina e miosina (7, 34, 60, 61).

Tropomiosina-Troponina

A tropomiosina é também uma proteína contráctil. A tropomiosina natural, algumas vezes referida como tropomiosina (peso molecular 56.000) e troponina (peso molecular 80.000), tem composição aminoacídica similar à miosina. A tropomiosina possui estrutura secundária (α -hélice), não se combina com a miosina, mas sugeriu-se que filamentos de actina são atacados na linha Z pela tropomiosina. A troponina, globular, comporta-se como se tivesse a função de ligar moléculas de tropomiosina às hélices de actina. A tropomiosina toma parte importante na contração muscular, em particular como sistema regulador sob ação de íons cálcio (20, 21, 34).

1.1.3- Proteínas do tecido conjuntivo

Colágeno

As fibrilas de colágeno consistem de uma tripla hélice, contendo a maior quantidade de hidroxiprolina quando comparadas a qualquer outra proteína da carne (aproximadamente 12,8 %). Quando aquecidas a 70 °C as fibras encurtam a um terço do comprimento original. A temperaturas de 80 °C ou mais, o colágeno é convertido em gelatina (16, 20, 21, 34).

O colágeno é uma glucoproteína possuidora de uma pequena quantidade de galactose e glucose. Sua distribuição não é uniforme no músculo esquelético, mas quantidades iguais de colágeno implicam em uma mesma atividade física dos músculos (34).

É relativamente insolúvel e devido à sua alta tensão forma pontes cruzadas intermoleculares, influenciando na maciez da carne (20, 34, 60).

Reticulina

Alguns pesquisadores consideram a reticulina como sendo formas "imaturas" de colágeno. Estão presentes durante o desenvolvimento embrionário e com o crescimento são superadas numericamente pelo colágeno. As fibras são finas e ramificadas e frequentemente estão intimamente ligadas ao endomísio do tecido

muscular. A reticulina é semelhante ao colágeno em alguns aspectos, porém não produz gelatina com o aquecimento (20, 34).

Elastina

A elastina é a proteína menos abundante no músculo e contém dois aminoácidos pouco comuns, como a desmosina e a isodesmosina, os quais estão envolvidos na ligação cruzada de cadeias peptídicas, responsáveis pelas propriedades elásticas (16, 20, 21, 34, 60, 61).

Não é decomposta pelo calor e contém pouca hidroxiprolina. O conteúdo em valina é muito maior. Devido ao pequeno número de cadeias carregadas da molécula é muito resistente à ácidos e álcalis (7, 21, 60).

As fibras são facilmente esticadas, ocorrendo seu ponto de quebra aproximadamente a 150 % de seu comprimento original. As fibras voltam ao seu tamanho original após serem esticadas. A elastina é extremamente insolúvel devido ao alto teor em aminoácidos não polares e às ligações que agregam quatro cadeias vizinhas de elastina, através de ligações intermoleculares de unidades de lisina. É altamente resistente às enzimas digestivas e não contribui no valor nutritivo da carne (20, 34).

A composição em aminoácidos essenciais e não essenciais da proteína da carne é constante, observadas as espécies animais, porções ou órgãos dos quais é obtida. Uma exceção é observada com relação às carnes que contenham grandes quantidades de tecido

conjuntivo. A composição em aminoácidos do tecido conjuntivo é diferente da do músculo e da dos órgãos, pois contém quantidades menores de triptofano e tirosina (20, 50, 60).

Alguns autores demonstraram que o conteúdo em arginina, valina, metionina, isoleucina e fenilalanina é maior em relação à outros aminoácidos com o aumento da idade de um animal. O conteúdo em aminoácidos pode diferir em diversas partes da carcaça (20, 50, 60, 61).

1.2 - As enzimas proteolíticas

As proteases pertencem ao grupo das enzimas mais importantes para a indústria de alimentos. Uma enzima proteolítica específica requer algumas condições ideais para hidrolisar a ligação peptídica (62, 102).

A natureza dos grupamentos presos a cadeia peptídica é um fator de distinção entre as proteases. A tripsina hidrolisa a ligação peptídica somente quando o radical é um resíduo de arginina ou lisina (102, 105).

Muitas proteases hidrolisam outros tipos de ligações e não somente ligações peptídicas. Estas podem ser substituídas por uma amida (-NH₂), éster (-COOR), tioéster (-COSR) ou hidroxamato (-CONHOH) (62, 102).

HARTLEY, em 1960 (38), sugeriu dividir as enzimas proteolíticas em quatro grupos, conforme seu mecanismo de ação :

- . proteases serínicas: incluem a tripsina, a quimotripsina, a elastase e a subtilisina; são inibidas por diisopropilfluoridrato. Essas endopeptidases contêm o grupo imidazol como sítio ativo;
- . proteases sulfidrílicas: incluem as enzimas de origem vegetal, tais como papaína, bromelina e ficina e a protease A de estreptococo; são inibidas por agentes sulfidrílicos. A semelhança entre elas deve-se a sequência aminoacídica em torno de resíduos cisteinil e histidil do sítio ativo ;
- . metaloproteases: representadas pelas carboxipeptidase A e B, glicil-glicina dipeptidase, leucina aminopeptidase, amino-acil-L-prolina hidrolase e iminodipeptidase; são exopeptidases inativadas por agentes quelantes metálicos; e
- . proteases ácidas: incluem a pepsina e a renina; necessitam de baixo valor de pH como ótimo.

As condições e sítios de ação de algumas enzimas proteolíticas estão resumidos no quadro seguinte :

Condições e sítios de ação de algumas enzimas proteolíticas.

proteases	valor de pH ótimo	temperatura ótima (°C)	sítios de ação
bromelina	5.0 a 8.0	50 a 60	inespecífico, colágeno
ficina	5.0 a 8.0	50 a 65	inespecífico, colágeno e elastina
neutrase	5.5 a 7.0	50 a 60	Tyr, Phe, Trp
papaína	6.0 a 7.0	60 a 80	Arg, Lys, His, Gly, Glu, Gln, Leu, Tyr, actinomiosina, elastina e colágeno
pepsina	2.0 a 4.0		Phe, Trp, Tyr, e vários outros exceto Pro e Ile
quimotripsina*	7.0 a 9.0	23 a 40	Phe, Trp e Tyr
tripsina	7.0 a 9.0	23 a 40	Lys e Arg

FONTE: WHITAKER (102), YAMAMOTO (105), PETERSEN (80) e BEHLTZ (14).

Tyr= tirosina, Phe= fenilalanina, Trp= triptofano, Arg= arginina, Lys= lisina, His= histidina, Gly= glicina, Glu= ácido glutâmico, Gln= glutamina, Leu= leucina, Pro= prolina.

Devido à grande eficiência das enzimas, normalmente apenas uma pequena quantidade é exigida no processo. Uma molécula de enzima é capaz de catalizar a conversão de 100 a 1000 moléculas de substrato em alguns segundos. Além do mais, sendo catalizadores, suas quantidades permanecem inalteradas e não influem no balanço energético global da reação (102).

O conhecimento e a quantificação da atividade enzimática é importante porque permite acompanhar a produção e isolamento das enzimas; padronizar e determinar as propriedades dos preparados enzimáticos comerciais e determinar a quantidade correta de enzima a ser adicionada no processo (14).

Em muitas preparações a concentração molar real da enzima é desconhecida e a quantidade deve ser expressa em termos de sua atividade (14, 102).

A "Comission on Enzymes of the International Units of Biochemistry" recomenda que a unidade de enzima seja definida como a quantidade que catalisará a conversão de um umol de substrato por minuto sob condições definidas. A concentração de proteína deverá ser expressa em mg de proteína (ou nitrogênio) por ml. Quando unidades de enzima/ml são divididas por mg de proteína por ml, o resultado é a atividade específica correspondendo ao número de enzima por mg de proteína (14).

1.3. - A hidrólise enzimática das proteínas

A complexidade de muitas proteínas torna difícil o estudo do processo de hidrólise enzimática. O processo básico em si é a quebra da ligação peptídica que ocorre segundo as etapas (40, 80) :

a. Abertura da ligação peptídica :

b. Troca de prótons :

c. Rearranjo

$$\text{pK}_a = 7.7 \text{ (25 } ^\circ\text{C)} : 7.1 \text{ (50 } ^\circ\text{C)}$$

Numa proteína constituída de 20 aminoácidos, existem 380 ligações peptídicas como local provável de ataque enzimático. Destas, uma determinada enzima é capaz de atacar apenas ligações que estejam disponíveis à ação enzimática devendo-se levar em conta também sua especificidade com relação aos aminoácidos (27).

A estrutura tridimensional de uma proteína dificulta a ação da enzima tornando a hidrólise limitada (102) .

A denaturação de uma proteína é o processo pelo qual a proteína ou o polipéptido passa do estado arranjado para o desarranjado sem ruptura da ligação covalente (62). Pode ser causada pelo aquecimento, alta pressão, sais, ácidos, álcalis , alcoóis ou agentes denaturantes como a ureia (35). A denaturação leva a modificações nas propriedades físicas como a perda da solubilidade da proteína podendo torná-la hidrolisável (80).

Na vizinhança de seu ponto isoelétrico uma proteína no estado nativo possui baixa solubilidade. A hidrólise aumenta a solubilidade das proteínas, podendo tornar útil e vantajoso o uso desta proteína em alimentos (1, 8, 22, 80, 88).

A possibilidade de uma proteína em formar emulsões estáveis tipo óleo em água estáveis é uma das propriedades funcionais úteis das proteínas nos alimentos. A capacidade emulsificante de uma proteína pode aumentar consideravelmente com o ataque enzimático, esta dependerá do grau de hidrólise (80).

A pré-hidrólise enzimática tem efeito drástico na expansibilidade da proteína, isto é, afeta a capacidade de incorporação de ar quando a solução é agitada vigorosamente (40, 80).

O sabor de uma proteína e de seu hidrolisado é chave em muitas aplicações e deve-se a fatores extrínsecos e intrínsecos.

O potencial do amargor está associado à composição aminoacídica da proteína (1, 46, 65, 74).

Segundo NEY (73), os aminoácidos hidrofóbicos, em particular, são os responsáveis pelo amargor, relacionam-se com a estrutura da proteína nativa e estão isolados do contato com outras substâncias responsáveis pelo sabor.

Os peptídeos resultantes da hidrólise enzimática expõem seus aminoácidos do interior da estrutura, permitindo a interação destes com as substâncias do sabor e promovendo assim o aparecimento do sabor amargo.

Evidências experimentais suportam esta teoria. A gelatina contém menor teor de aminoácidos hidrofóbicos e produz hidrolisados com sabor menos amargo que a caseína. Esta por sua vez, possui muitos aminoácidos hidrofóbicos e tende a fornecer hidrolisados mais amargos (73, 90).

1.4 - Revisão da literatura

Hidrolisados protéicos podem ser produzidos para três propósitos distintos : para modificar as propriedades funcionais das proteínas; para a produção de pequenos peptídeos ou aminoácidos para uso em produtos dietéticos ou com finalidades especiais, e ainda, como agentes flavorizantes (1, 53, 70, 80).

Os hidrolisados protéicos têm sido utilizados na indústria de alimentos há setenta anos e suas propriedades foram redescobertas nos últimos vinte anos.

Aplicação muito interessante das enzimas proteolíticas é aquela patenteada pela Swift & Co. (93) , nos Estados Unidos. Uma solução de papaína oxidada (protease de Carica papaya), cerca de 1,5 mg/kg de peso de animal vivo, é injetada na veia jugular do animal, 30 minutos antes do abate. As carcaças são refrigeradas normalmente, enquanto a papaína é reduzida a sua forma ativa pela atmosfera redutora do músculo "post-mortem" . Após esse tratamento, a maciez da carne cozida foi maior do que a da carne não tratada com a enzima. Todavia , o custo dessa tecnologia é muito elevado.

Aplicações de processos enzimáticos na modificação da proteína da carne bovina vem sendo alvo de muitos estudos. Na indústria de carnes a recuperação da proteína dos ossos, a liberação de gorduras, a produção de hidrolisados protéicos de carne para uso em condimentos, em dietas específicas, em sopas desidratadas, em pós e nas carnes processadas (66, 80, 103).

O emprego de hidrolisados protéicos de carne em dietas especiais, como o enriquecimento de alimentos a serem ministrados a pacientes com fenilcetonúria, em alimentação enteral ou ainda, em nutrição parenteral total tem sido relatado (35, 51).

Alguns autores estudaram a utilização de hidrolisados protéicos com características intensas de sabor e aroma, com alto teor de peptídeos na produção de derivados de carne.

Além dos estudos relacionados com a tenderização da carne iniciados em 1953 por HAYS et al. (99), seguidos por SHIMOKOMAKI (93), PENNY et al. (79) e KNIGHT, 1986 (55) já pode ser evidenciada a utilização de enzimas proteolíticas em processos industriais.

HUFFMAN et al., 1961 (44) utilizaram a injeção de papaína no pré-abate para tenderização da carne do peito de frango.

HINRICHS e WHITAKER, 1962 (41) estudaram a ação da ficina na degradação do colágeno, a qual ocorre sob ação do calor, em baixo valor de pH ou em meio contendo alta concentração de sais, propiciando uma melhor ação da enzima.

EL-GHARBAWI e WHITAKER, 1963 (27) investigaram os efeitos do valor de pH, da concentração da enzima, da presença de cisteína, do cloreto de sódio e da temperatura na solubilização das proteínas do biceps femoris de carne bovina quando tratado pela ficina e pela bromelina.

McINTOSH e CARLIN, 1963 (72) estudando a ação da papaína sobre o músculo esquelético da carne bovina, concluíram que todas as frações da proteína foram afetadas pela enzima, sendo que a mucoproteína e o colágeno foram os mais atacados e que o efeito tenderizador resulta da quebra da estrutura ou da rede do tecido conjuntivo.

OTAKA e HONGO, 1965 (76) testaram papaína, protease de *Streptomyces* e de *Aspergillus oryzae* sobre a carne bovina.

Evidenciaram que a papaína apresentou maior efeito de hidrólise sobre o colágeno e a elastina.

DJORJEVIC et al. , 1966 (24) estudando a ação da papaína, da ficina e mistura papaína, ficina e bromelina sobre a carne, concluíram que as proteases promoveram digestibilidade, hidratação e tenderização da proteína. Esses resultados são válidos para injeção das enzimas via jugular no animal e não o são para aqueles por imersão.

HUFFMAN et al. , 1967 (43) injetaram papaína durante as operações pré-abate do gado, o procedimento resultou num aumento da tenderização da carne em vários graus, verificado em distintas partes da carcaça.

KANG e RICE, 1970 (47) separaram o músculo de carne bovina de acordo com a solubilidade. A fração solúvel em água foi mais resistente à hidrólise enzimática frente a colagenase, bromelina e tripsina (exceção feita àquelas tratadas com papaína e Rhozyma P-II). A fração solúvel hidrolisada era formada de peptídeos menores que os fragmentos solúveis da fração não hidrolisada.

O estudo da ação das enzimas proteolíticas papaína, bromelina, ficina, tripsina e protease microbiana sobre o músculo semi-tendinoso foi desenvolvido por PARK e DRAETTA (77), em 1971. As enzimas apresentaram, à mesma temperatura, eficiência relativa, na seguinte ordem : ficina > papaína > bromelina > protease microbiana > tripsina.

Em 1974, KANG (48) estudou a tenderização da carne utilizando a papaína, e KITAYAMA et al., 1975 (54) observaram a ação da papaína a 0,1 % durante 60 minutos e concluíram ser interessante na tenderização da carne.

BARUFFALDI et al. , 1975 (8) estudaram a digestão enzimática da carne bovina " in vitro " com papaína, ficina e bromelina. O hidrolisado seco por liofilização, rico em proteínas solúveis, pode ser adicionado a dietas de pessoas em condições fisiológicas especiais.

GRUNDEN, 1977 (36) observou a ação da papaína, ficina e bromelina, protease e tripsina sobre a albumina da clara de ovo. A capacidade de incorporação de ar foi afetada, assim como o comportamento eletroforético veio acompanhado de uma diminuição do valor de pH .

RATTRIE e REGENSTEIN , 1977 (84) estudando a hidrólise pela papaína das proteínas miofibrilares do músculo de peito de frango, observaram ser a miosina digerida mais rapidamente que a actinmiosina. As proteínas das miofibrilas, especialmente quando contráteis, são rapidamente clivadas e outro componente, a actina, apresentou proteólise limitada.

HAMPTON , 1977 (37) descreve o processo de obtenção de hidrolisados protéicos de caseína , de gluten e de soja para serem utilizados sob a forma de pastas e de pós .

REGENSTEIN et al. , 1978 (85) submeteram a clara de ovo a hidrólise com ficina, bromelina, papaína, tripsina e

protease. Evidenciou-se a redução da força de coagulação das proteínas quando tratadas pela ficina e bromelina. A ficina diminuiu a quantidade da proteína não coagulada, havendo, ainda uma queda da estabilidade e aumento da quantidade de espuma.

ROBBINS et al., 1979 (87) observaram que a catepsina D degrada as zonas Z das miofibrilas da carne bovina e tem ação seletiva sobre a proteína miofibrilar quando comparada à papaína e parece ter pequeno efeito proteolítico sobre alfa - actinina ou actina.

BARUFFALDI et al., 1981 (9) estudaram a digestão enzimática "in vitro" da carne bovina e concluíram ser a ficina mais eficiente que a bromelina e a papaína.

PETERSEN, 1981 (80) cita várias aplicações para os hidrolisados protéicos :

- .hidrolisados de proteína de soja em "soft drinks" de banana , goiaba e manga ;
- .processo de tratamento de carnes com uso de hidrolisado de proteína de soja solúvel no ponto isoelétrico, para incorporação na solução de cura ;
- .uso de proteases no processo de fabricação da gelatina;
- .incorporação de hidrolisados de gelatina em alimentos líquidos como bebidas de baixa caloria , agentes dietéticos;

- .recuperação da carne do osso de animais após o abate e uso do hidrolisado para produtos como carne enlatada ou sopas;
- .produção de leite de soja com uso de hidrólise enzimática em duas etapas do processo ;
- .hidrólise enzimática dos grãos de trigo para aumentar a solubilização das proteínas; e
- .descoloração da hemoglobina do sangue , sub-produto da indústria da carne para utilização na cura ou mistura com plasma sanguíneo para a produção de derivados da carne.

FREEMAN e SAWHILL, 1981 (33) prepararam hidrolisados de proteína usando resíduos de várias fontes, tratando com proteinase em meio alcalino. Obteve-se um produto com 84 % de hidrólise, capacidade de formação de gel e nenhuma substância protéica deteriorada.

SALMONA, 1982 (33) descreve que dipeptídeos e aminoácidos, resultantes de hidrolisados de caseína, podem ser usados em nutrição parenteral total.

SWAN, 1982 (96) descreve a produção técnica de hidrolisado de sangue de gado com protease alcalina, alcalase , obtendo um produto com 18 % de grau de hidrólise em 50 a 90 minutos a 55°C.

ASAKURA, 1982 (4) hidrolisou as proteínas da carne bovina observando a influência da relação enzima/substrato, temperatura e tempo de hidrólise no aumento do teor de sólidos solúveis; a bromelina apresentou maior rendimento em sólidos solúveis seguida da papaína e da ficina.

NUNES e GEROMEL, 1982 (75) produziram hidrolisado protéico de tilápia atingindo 6,0-7,5 % de nitrogênio não protéico em 45 minutos a uma temperatura de 50-60 °C utilizando bromelina a 1 % (E/P) .

KAGHUNATH e RAOS, 1984 (82) submeteram seis proteínas de origem vegetal e cinco de origem animal a digestão enzimática sequencial "in vitro" com pepsina, pancreatina-tripsina e erepsina; observaram a liberação de pequenos peptídeos principalmente nas proteínas de origem animal.

CHOI e RHEE, 1984 (22) estudaram atividade e propriedades funcionais da proteína de soja após hidrólise enzimática com enzimas vegetais, microbiana e tripsina. Alcalase microbiana e pronase foram as mais ativas.

CAILLAU e MORGAN, 1984 (19) sugerem que hidrolisados protéicos sejam utilizados diretamente como alimento e no processo para ensilagem de couro.

KOBAYASHI et al., 1985 (56, 57) estudaram a degradação da S1-caseína por enzimas de Irpex lactus, Mucor miehei e Endothia parasitica, comparando-as com a quimosina. A proteólise da S1-caseína pela enzima da Mucor miehei foi

similar à quimosina.

YURUKOV et al., 1985 (106) estudaram a hidrólise da proteína da carne de carneiro pré-aquecida e sob ação de pepsina e tripsina. A extensão da hidrólise diminuiu com o aumento da duração do tratamento.

KHABATAKE e DOI, 1985 (52) estudaram a proteólise da albumina com pepsina e observaram que a proteólise parcial não altera as propriedades de geleificação. O gel transparente estável resultante tem aplicação potencial na fabricação de vários produtos alimentícios.

KILARA, 1985 (53) descreve várias aplicações como a aceleração da velocidade de formação do aroma e sabor na maturação do queijo tipo cheddar com utilização de proteases ácidas, neutras, lipases e descarboxilases, resultando num queijo com melhor aroma e sabor, grande aceitabilidade, alta concentração de proteína solúvel e de ácidos graxos livres. Descreve também o uso de hidrolisados protéicos de peixes para enriquecimento de leite de cabra; recuperação das proteínas do sangue e hidrólise da proteína da semente de amendoim e algodão, com a finalidade de aumentar a solubilidade.

BEHNKE et al., 1985 (12) sugerem formulações com utilização de hidrolisados de proteína da carne bovina, suína e ovina, acrescidos de cloreto de sódio, gordura, aroma de carne e condimentos.

LIESKE et al., 1985 (63) estudaram a utilização de hidrolisados protéicos com características intensas de flavor e aroma, com alto teor de peptídeos na produção de derivados de carne, de produtos vegetais e de confeitaria.

ERNSTER, 1985 (28) obteve um hidrolisado protéico de caseína e utilizou-o como aditivo em alimentos baseados em atum enlatado.

SHANK, 1985 (91) preparou um hidrolisado de colágeno para utilização em alimentos, incluindo sobremesas e produtos alimentícios em forma de gel.

BEHNKE et al., 1986 (13) estudaram a modificação enzimática da proteína da clara de ovo usando termitase (protease de Thermoactinomyces vulgaris) e pancreatina. Nos casos de baixo ou de médio grau de hidrólise, a modificação enzimática ocorrida resulta em produto com melhor funcionalidade que o material de partida.

VALLEJO-CORDOBA et al., 1986 (99) incorporaram hidrolisados protéicos de soja, obtidos por tratamento com alcalase, a molhos crus e evaporados de carne fervida com a finalidade de diminuir a atividade de água e aumentar a vida de prateleira de produtos de carne.

DUSCHANEK et al., 1986 (26) obtiveram um hidrolisado protéico a partir de resíduos da indústria da carne com a utilização de protease neutra para preparação de derivados de carne para o consumo humano.

ERNSTER, 1986 (29) tratando a caseína com protease microbiana (Milezyme AFP ou neutrase) e hidróxido de sódio, obteve um hidrolisado livre de "flavor" com boas propriedades emulsificantes para incorporação em bebidas e produtos processados de carne.

QUAGLIA e ORBAN, 1987 (81) hidrolisaram sardinhas desengorduradas usando alcalase. Vários produtos foram obtidos de tratamentos com diferentes graus de hidrólise pela variação da relação enzima/substrato e do tempo de hidrólise .

STABILE e BARUFFALDI, 1988 (94) estudaram a hidrólise de clara de ovo usando papaína, tripsina e protease, tendo chegado a produto de alta solubilidade, contendo aminoácidos na forma livre.

1.5. - Alimentação enteral

Segundo PEIRO E TORRES, 1983 (78) alimentação enteral significa aportar nutrientes através da via digestiva ou nutrir um indivíduo, independente do tipo de alimento, administração e técnica para fazê-lo.

Todo paciente com capacidade para digerir e absorver alimentos e/ou nutrientes em quantidade suficiente para sua manutenção e anabolismo de novas proteínas deve ser nutrido por via enteral.

As vias de administração utilizadas na alimentação enteral são:

- oral: considerada ideal, conta com a cooperação voluntária do doente; é a via de aporte suplementar de calorias para pacientes desnutridos e serve como método de preparação para cirurgia de cólon;

- intubação naso-gástrica: feita por sondas, produz irritação e problemas respiratórios;

- vias cirúrgicas: faringostomia, gastrostomia, esofagostomia e jejunostomia.

Um período de jejum inferior a uma semana, não constitui em princípio, indicação para nutrição enteral. As indicações propriamente ditas são : fistulas do trato gastrointestinal, ressecção maciça do intestino delgado, preparação do cólon para cirurgia, doenças inflamatórias intestinais, quimio e radioterapia, pancreatite, e impossibilidades gerais de ingestão de alimentos, tais como anorexia nervosa, cirurgia da cabeça e pescoço, úlceras, chagas na boca, disfagia, acidente cerebrovascular, hipertiroidismo, traumatologias (queimaduras e politraumatismos), terapêutica neoplásica, insuficiência renal e hepática, disfunções metabólicas do recém-nascido e pré-operatório de doentes com deficit nutritivo e, disfunções neurológicas (6, 68, 69, 78).

A alimentação enteral é contra-indicada para pacientes com fistulas jejunaes, transtornos metabólicos severos ou ileo

paralítico, síndrome de malabsorção e pacientes com diabetes severa.

Ante a variedade de produtos disponíveis para nutrição enteral, a eleição de um ou mais não é tarefa fácil. Segundo BOTH e col. (17) os preparados são classificados como:

- preparados usados como suplemento nutritivo: utilizados para acompanhar a alimentação regular, não possuem todos os nutrientes, geralmente contém alto teor protéico e densidade calórica superior a 2 Kcal/ml;

- preparados usados para reposição das necessidades nutritivas: são aqueles administrados via oral ou por sondas, contém 1 Kcal/ml e as proteínas devem corresponder a 14 % das calorias totais;

- preparação de composição química definida ou dieta elementar: dieta composta de uma mistura carente de resíduos, contendo no mínimo 150 a 200 calorias não protéicas/g nitrogênio, com a qual se assegura que os aminoácidos foram utilizados para a síntese protéica e não para a glicogenólise. Sua composição deve ser de aminoácidos (35 % de essenciais e 65 % de não essenciais), hidratos de carbono, lipídeos, eletrólitos, vitaminas e etc. As dietas devem ser líquidas, de reduzido volume e de fácil emprego e,

- preparados formulados para o desenho de dietas modulares: são aqueles preparados à base de componentes únicos, como proteínas, carboidratos e lipídeos ou, ainda, vitaminas ou

minerais. Esses permitem a individualização das dietas, segundo necessidades específicas e patologia do doente.

A preparação e conservação das unidades nutrientes deve ser simples e de fácil manejo. A dieta padrão melhor tolerada pelo intestino é de 1 Kcal/ml com osmolaridade 30 mOsm/l. Recomenda-se usá-la até 24 horas após o preparo e armazenamento de até 8 horas a temperatura ambiente. Após decorrido este tempo, armazená-la numa temperatura de 8 °C.

Quanto mais baixa for a situação da sonda no intestino delgado, tanto menor será o máximo de alimentos e calorias a administrar, pois o processo de assimilação se dá por redução da superfície de absorção e tempo de trânsito pelo trato gastrointestinal.

Durante as primeiras 24 horas do início da nutrição enteral, recomenda-se que o aporte de calorias seja de 1/3 cal/ml do total que se deseja administrar. Se há tolerância, aumenta-se para 2/3 no segundo dia e para 1 cal/ml no terceiro dia.

A velocidade de perfusão deve proporcionar quantidade de água suficiente para cobrir as necessidades diárias. Deve-se limpar a sonda, antes e depois da alimentação, com água destilada.

TAKEDA e OKEDA (97) estudaram a utilização de carne pré-digerida em dietoterapia e concluíram ser um substituinte da albumina humana ministrada por via parenteral, do leite em casos alérgicos e de produtos laboratoriais com vantagens econômicas (98).

II - OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho consistiram em estabelecer as seguintes condições de processamento para a obtenção de hidrolisados protéicos de carne bovina :

- estudo da ação enzimática da papaína, tripsina e protease microbiana, isoladas e em mistura, sobre as proteínas da carne bovina;
- determinação das condições de reação para a hidrólise enzimática das proteínas : influência da temperatura, do valor de pH e do tempo de hidrólise sobre a solubilidade das proteínas;
- determinação do teor do material solubilizado e do grau de hidrólise das proteínas nas condições pré-estabelecidas e de algumas propriedades funcionais como viscosidade e capacidade de emulsificação;
- identificação e caracterização das substâncias resultantes da hidrólise enzimática .

A pesquisa é parte de um projeto mais amplo com a finalidade da elaboração de um preparado formulado para utilização em alimentação enteral.

III -- MATERIAIS

1- Matéria-prima

Carne bovina (porção conhecida no mercado pelo nome de "patinho") submetida a tratamento prévio pela retirada de aponevroses e gordura visível .

2- Enzimas

Tripsina de pâncreas de boi (Proteomix 2000), preparado fornecido pela Biobrás, Belo Horizonte, MG.

Atividade: Tripsina : Min.1234 UUSP/mg
 Quimotripsina : Min. 988 UUSP/mg

Papaina 750, preparado fornecido pela Wallerstein, Copenhagen, Dinamarca.

Atividade: 45.000-50.000 NF/mg

Protease de microorganismo , Neutrase 1,5 G , preparado fornecido pela NOVO Industri do Brasil Ind. e Com. Ltda, Curitiba, PR.

Atividade: 1,5 Au/g

3- Equipamentos de laboratório

- Agitador de tubos Phoenix mod.AT56
- Agitador magnético com aquecimento Fisatom mod.706A
- Agitador mecânico Fisatom mod.712

- Amassadeira com temperatura controlada Readco
- Aparelho de destilação de nitrogênio Tecnal mod.036
- Balança analítica Sauter mod. 404/11
- Balança semi-analítica Marte mod.A-1000
- Balança semi-analítica Stanton D42T
- Balança Filizola
- Banho-maria com temperatura controlada Fanem mod.102/1
- Banho-maria com temperatura controlada Fanem mod. 100
- Câmara frigorífica Mecalor
- Centrifugador Fanem mod.204 NR
- Centrifuga refrigerada Incibrás
- Chapa elétrica de aquecimento Marchesoni mod.25
- Chapa elétrica de aquecimento Marchesoni mod.50
- Densitômetro Quick Quanti II, Helena Lab. Corp.
- Espectrofotômetro Bausch-Lomb Espectronic 70
- Estufa de secagem e esterilização Fanem mod.315/2-SE
- Estufa de secagem e esterilização Fanem mod.315/4-SE
- Estufa com circulação forçada de ar Fabbe mod. 170
- Freezer vertical Brastemp 270 l
- Geladeira Prosdócimo 340 l
- Micro-digestor Tecnal mod. TE-8-25
- Microscópio Nikon Labophot
- Microscópio Reichert
- Moedor de carnes Hobart mod.84181D
- Potenciômetro Metrohm Herisau mod. E 520
- Refratômetro Atago mod. CAT-325
- Vidraria e materiais comuns de laboratório
- Viscosímetro Brookfield Synchro-Lectric, mod. LVT.

4- Reagentes analíticos

- Acetona
- Acetato de cádmio
- Ácido acético glacial
- Albumina bovina, fração V (Sigma)
- Carbonato de sódio anidro
- Fosfato de sódio monobásico
- Fosfato de sódio dibásico
- Hidróxido de sódio
- n-Butanol
- Ninhidrina
- Padrões de aminoácidos : alanina, cistina ,
fenilalanina, histidina, leucina, lisina, tirosina,
treonina e valina.
- Padrões para eletroforese : albumina bovina (PM
66000), albumina de ovo (PM 45000), pepsina (PM
34700), tripsinogênio (PM 24000), beta-lactoglobulina
(PM 18400), lisozima (PM 14300), SDS-6 (mioglobina
polipeptídeo, PM16950 ; mioglobina fragmento I + II,
PM 14400 ; mioglobina fragmento I, PM 8160 ;
mioglobina fragmento II, PM 6210 e mioglobina
fragmento III).
- Reativo de Folin-Ciocalteu marca QEEL
- Sulfato cúprico anidro
- Tartarato duplo de sódio e potássio

5- Soluções reagentes

a - Solução alcalina

Carbonato de sódio anidro	20 g
Hidróxido de sódio	4 g
Água destilada	1.000 ml

b - Solução de sulfato cúprico

Sulfato cúprico anidro	2 g
Água destilada	100 ml

c - Solução de tartarato de sódio e potássio

Tartarato duplo de sódio e potássio	4 g
Água destilada	100 ml

d - Mistura reativa

As soluções a , b e c são respectivamente misturadas na proporção de 100 : 1 : 1 .

e - Reativo de Folin-Ciocalteu

A solução estoque deve ser diluída com água destilada na proporção de 1 : 2 .

- f - Solução tampão fosfato (valor de pH = 7,0)

Solução A (solução de fosfato de sódio monobásico)

Dissolver 27,8 g em 1.000 ml de água destilada .

Solução B (solução de fosfato de sódio dibásico
0,2 M)

Dissolver 53,65 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ou 71,7 g
de $\text{NaHPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ em 1.000 ml de água destilada .

Preparação da solução tampão :

Misturar 39,0 ml da solução A e 61,0 ml da solução
B. Diluir para 100 ml .

- g - Solução tampão fosfato (valor de pH = 6,0)

Misturar 87,7 ml da solução A e 12,3 ml da solução
B, citadas anteriormente. Diluir para 100 ml.

- h - Solução padrão de aminoácidos para cromatografia
em camada delgada

Histidina ou lisina	10 mg
Glicina	15 mg
Alanina	5 mg
Treonina	5 mg
Tirosina	1 mg
Fenilalanina	2 mg

Leucina	2 mg
Cistina	1 mg
Valina	1 mg

Dissolver em 10 ml de isopropanol a 10 % em água destilada e acrescentar algumas gotas de HCl 1 N .

i - Fase móvel para cromatografia em camada delgada

n-Butanol	35 ml
Acetona	35 ml
Acido acético glacial	10 ml
Água	20 ml

j - Solução reveladora para cromatografia de aminoácidos

Solução de acetato de cádmio a 5 % em ninidrina etanólica (1 g de ninidrina em 95 ml de etanol e 5 ml de água destilada) .

l - Solução N (solução de acrilamida 30 % para o gel de SDS)

Acrilamida	7,3 g
N,N-metilenobisacrilamida	0,2 g

Dissolver e diluir a 25 ml com água destilada e filtrar. A solução é estável por um mês quando estocada em frasco âmbar sob refrigeração a 0 - 5 °C.

m - Solução PA (persulfato de amônio 10 %)

Preparar diariamente. Dissolver 100 mg de persulfato de amônio em 1 ml de água destilada.

n - Solução L

Tris	18,17 g
SDS	0,40 g

Dissolver o tris em água destilada. O valor de pH deve ser aproximadamente igual a 8,8. Acrescentar o SDS e completar o volume para 100 ml. Estocar bem fechado sob refrigeração a 0 - 5 °C.

o - Solução M

Tris	6,06 g
SDS	0,40 g

Dissolver o tris em água destilada. O valor de pH deve ser aproximadamente igual a 6,8. Acrescentar o SDS e completar o volume para 100 ml. Estocar

bem fechado sob refrigeração a 0 - 5 °C.

p - Solução 0

Glicerol	2,5 ml
Beta-mercaptoetanol	1,2 ml
SDS	0,6 g
Tris-HCl	0,2 g

Dissolver o tris em água destilada. O valor de pH deve ser aproximadamente igual a 6,8 a 25 °C. Acrescentar o SDS, o glicerol e o beta-mercaptoetanol. Completar o volume a 25 ml com água destilada. A solução é estável por duas semanas quando mantida sob refrigeração entre 0 - 5 °C.

q - Tampão do gel

Tris	12,1 g
Glicina	57,6 g
SDS	4,0 g

Dissolver e diluir a 1 litro com água destilada. Antes da corrida diluir 4 vezes. Estocar bem fechado sob refrigeração a 0 - 5 °C.

r - Azul de bromofenol

Dissolver 10 mg de azul de bromofenol em 100 ml de água destilada.

s - Solução de coloração

Comassie brilliant blue R	1 g
Metanol	250 ml
Acido acético glacial	50 ml

Dissolver bem o azul de comassie no metanol. Acrescentar ácido acético e completar a 500 ml com água destilada.

t - Solução de descoloração I

Metanol	150 ml
Acido acético glacial	35 ml

Dissolver em 500 ml de água destilada. Esta solução deverá ser usada uma única vez e descartada. Estocar bem fechada a temperatura ambiente.

u - Solução de descoloração II

Metanol	25 ml
Acido acético glacial	35 ml
Glicerol	15 ml

Dissolver em 500 ml de água destilada. Usar na última lavagem para não quebrar o gel durante a secagem.

Preparação da amostra

A amostra de proteína desconhecida deve ser preparada pesando-se amostras de modo a terem uma concentração de 1 mg proteína/ml solução O.

Preparação dos padrões

Os padrões devem ser reconstituídos em solução O, como o indicado a seguir.

proteína		concentração tampão ótima	
		(mg/ml)	(ml)
albumina bovina	PM 66000	1,5	17,0
albumina ovo	PM 45000	1,5	17,0
pepsina	PM 34700	5,0	5,0
tripsinogenio	PM 24000	2,0	12,5
beta-lactoglobulina	PM 18400	1,0	25,0
lisozima	PM 14300	1,0	25,0
SDS-6	mistura	---	1,0

Aliquotas podem ser congeladas a -20°C para uso futuro. Todas as proteínas devem ser incubadas a 37°C por 2 horas em tampão de amostra (reagente A) antes da eletroforese. Quantidade de amostra a ser aplicada 10 μl /gel.

Preparação do gel para eletroforese

- Misturar conforme esquema a seguir a água destilada, a solução L e a solução N de acordo com a concentração de gel desejada. Desaerar por um minuto.

	<u>gel empacot.</u>	<u>gel de separação</u>			
		5 %	7 %	10 %	15 %
água destilada (ml)	3,0	5,3	4,8	4,2	2,5
solução L (ml)	---	3,1	2,4	2,5	2,5
solução M (ml)	1,25	---	---	---	---
solução N (ml)	0,75	1,7	2,4	3,3	5,0

- Adicionar 0,066 ml de persulfato de amônio a 10 %.
- Adicionar 0,001 ml de TMEDA .
- Misturar a solução cuidadosamente para evitar a introdução de ar.
- Dispensar sobre as placas devidamente preparadas. Primeiramente o gel de corrida e após a

polimerização deste, o gel de empacotamento. Sobre a camada de gel adicionar isopropanol para evitar a entrada de ar e nivelar o gel.

Eletroforese

A eletroforese é realizada com a aplicação de uma corrente constante de 20 miliamperes/gel com o eletrodo positivo na cuba inferior.

- Diluir 250 ml do tampão do gel em 500 ml de água e preencher os compartimentos da cuba de eletroforese.
- Colocar 10 μ l de amostra no gel.
- Aplicar uma corrente de 15 miliamperes/gel até que a mancha marcada (azul de bromofenol) esteja a 1 cm do final anódico do gel (mais ou menos 5 horas).
- Remover o gel.

Coloração e descoloração

- Marcar o centro do front .
- Mergulhar os geis em solução de coloração por no mínimo 10 horas.
- Descolorir em solução de descoloração, lavando diversas vezes . Na última lavagem usar a solução de descoloração II para evitar a quebra do gel durante a secagem.
- Anotar a distância de migração da mancha marcada e da zona azul de proteína no topo do gel.

IV - METODOS

1- Medida da atividade enzimática

Foi determinada pelo método de LOWRY et al. (64) dosando-se a proteína presente no filtrado, após a reação de 2,0 ml de uma solução a 1 % de caseína com a enzima seguida de precipitação com ácido tricloroacético.

Adicionou-se a uma alíquota de 0,5 ml do filtrado 5 ml da solução " d ", citada anteriormente. Homogeneizou-se a mistura e deixou-se em repouso por 10 minutos. A seguir, adicionou-se 0,5 ml do Reativo de Folin-Ciocalteu. Após 30 minutos, leu-se a intensidade de cor desenvolvida num comprimento de onda igual a 660 nm .

A comparação entre as absorbâncias e a concentração de proteína foi feita através de uma curva padrão, utilizando-se volumes crescentes de uma solução de albumina bovina na concentração de 0,4 mg/ml, segundo o esquema :

tubo	sol.prot.	água dest.	mist.reat.	reat.Folin	abs.média
n	(ml)	(ml)	(ml)	(ml)	
0	---	0,5	5,0	0,5	----
1	0,1	0,4	5,0	0,5	0,070
2	0,2	0,3	5,0	0,5	0,140
3	0,3	0,2	5,0	0,5	0,220
4	0,4	0,1	5,0	0,5	0,265
5	0,5	---	5,0	0,5	0,325

A correspondência entre a absorbância e a concentração de proteína obtida experimentalmente define a seguinte equação :

$$y = 0,003499 + 0,001712 x \quad r = 0,997$$

onde : y = absorbância

x = concentração de proteína (ug)

r = coeficiente de correlação linear

2- Determinação da concentração de sólidos solúveis

A determinação da concentração de sólidos solúveis foi feita por interpolação em uma curva padrão obtida gravimetricamente. Tomaram-se aliquotas do material em estudo, contendo os sólidos solúveis e filtrou-se. A seguir, prepararam-se soluções de concentrações decrescentes e determinou-se (escala de um refratômetro) a refração de cada uma das soluções. Evaporou-se em estufa a 105°C até peso constante e determinou-se a massa do resíduo de evaporação. Estas determinações serviram de base para a calibração do refratômetro. A correspondência entre concentração de sólidos e graduação da escala foi feita pela equação :

$$y = 1,7666 + 0,7620 x \quad r = 0,9995$$

onde : y = concentração de sólidos solúveis (g/100g)

x = leitura na escala

r = coeficiente de correlação linear

Figura 1 : Curva de referência para a dosagem de proteínas pelo método de LOWRY.

Figura 2 : Curva de referência para a interpolação da leitura na escala do refratômetro da concentração de sólidos solúveis.

3 - Grau de hidrólise

O grau de hidrólise foi obtido por cálculo, segundo a definição :

$$GH (\%) = \frac{\text{concentração de sólidos solúveis}}{\text{teor inicial de nitrogênio}} \times 100$$

4- Medida da viscosidade

A determinação da viscosidade foi feita a 30 e a 60°C . Foi utilizado um viscosímetro Brookfield Synchro-Lectric modelo LVT, acoplado de "spindles" cilíndricos. Amostras retiradas no transcorrer da hidrólise com a mistura de enzimas, foram colocadas em bequeres de 600 ml e submetidas à inativação enzimática. No momento do uso foram imersas em banho-maria com temperatura controlada durante duas horas com a finalidade de eliminar-se bolhas de ar e atingir-se o equilíbrio térmico.

As medidas foram feitas após a imersão de cada "spindle". A fim de obter-se o equilíbrio térmico do sistema e minimizar-se uma possível dependência com o tempo, as leituras foram tomadas a cada minuto durante os seis primeiros minutos e, aos dez e quinze minutos. A viscosidade foi determinada em diferentes velocidades de rotação.

Testou-se a aplicabilidade do modelo de Ostwad-de Waele no tratamento dos resultados.

5 - Capacidade de emulsificação

As amostras a serem emulsificadas foram suspensas em 50 ml de tampão fosfato a valor de pH = 7,0 em bequer de 250 ml. Estas, deixadas em banho-maria a temperatura não superior a 30°C foram mantidas sob agitação. Após a estabilização da temperatura, procedeu-se à emulsificação da proteína, acrescentando-se 50 ml de óleo de soja, gota a gota, com o auxílio de uma bureta. As amostras foram agitadas durante 5 minutos.

A formação da emulsão foi observada através de provetas de 100 ml, onde determinou-se a quantidade de óleo não emulsificado. Diversas combinações de quantidades de proteína solúvel e óleo foram investigadas inicialmente para determinar-se a capacidade ótima do agitador.

A capacidade de emulsificação foi expressa em ml de óleo de soja emulsificado por 100 mg de proteína solúvel.

Fotomicrografias da emulsão foram feitas com microscópio Nikon Labophot e com microscópio Reichert para a observação da aparência da emulsão formada.

Foram feitas medidas dos diâmetros e da frequência de distribuição das gotas de gordura da emulsão nas fotomicrografias.

O tratamento dos resultados do diâmetro das gotas foi feito através do cálculo do diâmetro médio dado pela equação (11):

$$D = \frac{\sum x_i^2 n_i}{\sum x_i n_i}$$

onde : D = diâmetro médio

x_i = diâmetro dos glóbulos

n_i = número de glóbulos de diâmetro x_i

6- Fracionamento e identificação de aminoácidos

Os aminoácidos foram fracionados por cromatografia em camada delgada sobre celulose microcristalina. Os cromatogramas desenvolveram-se em n-butanol : acetona : ácido acético : água (35 : 35 : 10 : 20) volume a volume .

A visualização foi possível após vaporização com solução de acetato de cádmio a 5 % em ninidrina etanólica. A identificação foi feita com uma solução contendo padrões de aminoácidos , solução "h" , citada anteriormente (18).

7- Aminogramas

A análise quantitativa de aminoácidos foi feita em analisador automático, segundo o método preconizado por MOORE e col. (71).

Foram estudadas amostras sem tratamento e tratadas previamente por hidrólise ácida com ácido clorídrico 6N por 22 horas a $110 \pm 1^\circ\text{C}$ efetivos.

8- Eletroforese em gel de acrilamida

O método desenvolvido por LAEMMLI (59) foi utilizado para a avaliação do peso molecular dos peptídeos solúveis após hidrólise enzimática.

Os géis foram revelados em solução de coloração (soluções) por 10 horas e descoloridos em solução de descoloração (solução I e II) até a remoção da coloração de fundo do gel.

Os géis foram submetidos a densitometria em densitômetro Quick Quant II, Helena Lab. Corp.. As áreas dos picos obtidos no perfil eletroforético foram calculadas por pesagem em balança analítica e comparadas ao peso de uma área de 1 cm^2 e então expressas em unidades de área.

Os pesos moleculares foram determinados por interpolação em uma curva padrão do log PM versus a mobilidade relativa (R_f), usando-se padrões de PM de proteínas não hidrolisadas. A correspondência entre o log PM e o R_f foi feita pela equação :

$$y = 5,1074 - 1,0264 x \quad r = 0,9897$$

onde : $y = \log PM$

$x = R_f$

$r = \text{coeficiente de correlação}$

Figura 3 : Curva de referência para a estimativa do peso molecular de uma proteína desconhecida.
40 °C, em valor de pH 6,0 e 7,0.

9- Composição centesimal

9.1- Umidade e voláteis a 105 °C

O teor de umidade foi obtido pela determinação da perda de peso do produto submetido ao aquecimento a 105 °C , segundo o método do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (45) .

9.2- Teor de Nitrogênio

O valor de proteína foi obtido pela determinação do teor de nitrogênio total pelo método de micro-Kjeldahl, preconizado pela "ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS" (5) .

9.3- Determinação da fração extrato etéreo

A fração extrato etéreo foi obtida gravimetricamente pela determinação da perda de peso do material dessecado submetido à extração com éter etílico, empregando procedimento do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (45) .

9.4- Resíduo mineral fixo

A fração cinza foi obtida gravimetricamente pela determinação da perda de peso do material a 550 °C, segundo o método preconizado pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (45) .

10 - Controle microbiológico

A análise microbiológica, compreendendo contagem padrão em placas, bolores e leveduras, coliformes totais, coliformes fecais, Escherichia coli, Staphylococcus aureus e Salmonella sp, foi feita segundo os métodos preconizados pela "AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION" (2).

V - PARTE EXPERIMENTAL

Feita de acordo com o seguinte fluxograma :

A carne (porção conhecida no mercado pelo nome de "patinho") foi submetida a tratamento prévio para retirada de gordura visível e aponevroses e, a seguir, foi moída.

As enzimas utilizadas foram a papaína, a tripsina e a protease microbiana, respectivamente de origem vegetal, pancreática e microbiana.

As proteases foram submetidas a determinação de atividade com a finalidade de estabelecer-se a quantidade correta de enzima a ser adicionada ao processo. As enzimas foram testadas individualmente e em conjunto.

A matéria-prima limpa e moída foi utilizada no preparo de uma suspensão a 10 % de proteína, peso/volume, com solução tampão fosfato a valor de pH = 7.0 . A suspensão foi aquecida a 50-60 °C em misturador com temperatura controlada e mantida sob agitação constante.

Após a estabilização da temperatura, acrescentou-se as enzimas na proporção enzima : proteína de (1:100). Procedeu-se à hidrólise sob agitação durante três horas à temperatura e valor de pH verificados.

No decorrer da primeira hora da hidrólise, foram retiradas amostras, em bequer de 250 ml, aos 0, 15, 30 e 60 minutos e depois sucessivamente a cada 30 minutos perfazendo um total de 180 minutos de hidrólise.

As amostras retiradas foram levadas a banho-maria fervente durante 20 minutos com a finalidade de se inativarem as enzimas. Decorrido o tempo estabelecido para a inativação térmica das enzimas, as amostras foram filtradas a vácuo em funil de Buchner.

Paralelamente, foram retiradas amostras em bequeres de 600 ml para medidas de viscosidade e caracterização do comportamento do fluido no decorrer da hidrólise. Estas foram submetidas a tratamento térmico para inativação das enzimas, resfriadas e armazenadas congeladas em freezer a -18°C .

A partir do filtrado procedeu-se à determinação da concentração de sólidos solúveis; à avaliação do peso molecular dos peptídeos solúveis; ao fracionamento por cromatografia em camada delgada e à análise quantitativa de aminoácidos.

Os hidrolisados de carne obtidos foram, a seguir, secos em estufa com circulação forçada de ar, numa temperatura de 60°C por um tempo variando de 24-48 horas. Os produtos foram acondicionados em sacos plásticos.

O produto hidrolisado seco foi analisado com relação a composição química, capacidade de emulsificação de sua proteína, e perfil de aminoácidos.

VI - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cálculos realizados foram programados sobre uma planilha de cálculo, o Lotus 1-2-3, versão 2.1, bem como as figuras apresentadas.

1 - Atividade enzimática

A Tabela 1 apresenta os resultados da atividade enzimática da papaína, tripsina e protease microbiana sobre as proteínas da caseína.

As atividades enzimáticas foram determinadas para as enzimas isoladas e em mistura. A proporção das enzimas na mistura foi estabelecida em função de suas atividades.

A mistura teve a finalidade de se preparar um "pool" de enzimas com diferentes especificidades, procurando se obter maior atividade enzimática e conferir uma maior taxa de conversão das proteínas em produtos de menor peso molecular.

A papaína mostrou maior atividade a 60 °C. A atividade de 97,40 ug/ml.min foi obtida a um valor de pH = 7,0.

A tripsina apresentou maior atividade dentre todas as enzimas individualmente testadas. Foi de 107,62 ug/ml.min a 40 °C e valor de pH = 7,0.

A protease microbiana mostrou atividade menor dentre as proteases testadas individualmente. A maior atividade obtida foi de 55,05 ug/ml.min a 40 °C e valor de pH = 7,0.

Os resultados obtidos vão ao encontro dos da literatura verificada quanto às condições ideais de ação destas proteases (80, 102, 106).

A mistura 1, papaína : tripsina : protease microbiana (1:1:1), apresentou maior atividade a 40 °C e a valor de pH = 6,0 alcançando uma cifra de 86,30 ug/ml.min.

A mistura 2, papaína : tripsina : protease microbiana (2:1:2), alcançou atividade enzimática de 94,19 ug/ml.min a 60 °C e valor de pH = 7,0.

Dentre as misturas testadas, a maior atividade enzimática registrada foi para a mistura 2. Apesar de se tratar de uma mistura, não chegou a atingir os valores da papaína usada isoladamente.

A partir desses dados procedeu-se à seleção do processo e escolha dos parâmetros a serem utilizados no estudo, em função das atividades das enzimas, de suas especificidades e custo.

Tabela 1 : Atividade enzimática sobre a caseína.

	atividade enzimática (ug/ml.min)			
	valor de pH = 6,0		valor de pH = 7,0	
	40 °C	60 °C	40 °C	60 °C
papaína	65,86	77,10	79,29	97,40
tripsina	90,97	71,99	107,62	54,81
protease microbiana	44,97	23,80	48,04	55,05
mistura 1	86,30	74,91	80,75	82,21
mistura 2	85,86	59,28	73,16	94,19

mistura 1 - papaína : tripsina : protease microbiana, (1:1:1).

mistura 2 - papaína : tripsina : protease microbiana, (2:1:2).

Figura 4 : Atividade enzimática sobre a caseína, 40 °C, em valor de pH 6,0 e 7,0.

Figura 5 : Atividade enzimática sobre a caseína, 60 °C, em valor de pH 6,0 e 7,0.

2 - Solubilidade e grau de hidrólise

As Tabelas 2, 3, 4 e 5 mostram os valores da solubilidade e do grau de hidrólise (GH) alcançados pelas proteínas da carne bovina submetida a tratamento enzimático.

Observa-se um aumento da solubilidade das proteínas, isto é evidenciado pelo incremento da concentração de sólidos solúveis (CSS) ao longo do tempo até atingir-se um patamar onde ela se estabiliza, em razão de não haver maior quantidade de substrato.

A Figura 6 mostra a concentração de sólidos solúveis e o GH atingidos pelas proteínas da carne quando submetida a tratamento com papaína. Observa-se que logo aos 30 minutos a concentração de sólidos solúveis atinge o patamar de 11,9 g/100 g e se mantém estável até os 180 minutos. O GH é de 48,1 % e o valor de pH durante o tratamento cai de 6,3 para 6,0.

A solubilidade e o GH das proteínas da carne bovina, tratada pela tripsina, podem ser vistos na Figura 7. A concentração de sólidos solúveis é de 10,6 g/100 g aos 60 minutos quando atinge o patamar. O GH nesse tempo é de 48,6%. O valor de pH vai de 6,3 a 6,1.

Os resultados de solubilidade e de GH das proteínas da carne bovina, submetida a tratamento enzimático com protease microbiana, podem ser vistos na Figura 8. A taxa de hidrólise no patamar foi de 37,1% com uma concentração de sólidos solúveis

de 9,8 g/100 g, atingida somente após 120 minutos. O valor de manteve-se praticamente estável em torno de 6,2.

A Figura 9 mostra um aumento na concentração de sólidos solúveis das proteínas da carne bovina, quando tratada pela mistura de enzimas. Aos 30 minutos de hidrólise observou-se uma concentração de sólidos solúveis de 10,5 g/100 g, correspondendo a 41,0 % de GH. Decorridos 180 minutos, a concentração de sólidos solúveis atinge um máximo de 12,7 g/100g. Observa-se que 52,4 % de GH é atingido. O valor de pH é praticamente estável em torno de 6,2.

A mistura das enzimas papaína, tripsina e protease microbiana, nas proporções de 2 : 1 : 2, promoveu maior solubilização das proteínas da carne bovina que qualquer dessas enzimas, quando usadas individualmente.

As Figuras 10 e 11 mostram respectivamente a solubilidade e o grau de hidrólise das proteínas da carne bovina comparando os diferentes tratamentos. Observa-se que aos 15 minutos o menor GH é de 14 %, no qual utilizou-se a protease microbiana, enquanto, no mesmo tempo, a mistura de enzimas alcança 30 % de GH, portanto com efetividade acima do dobro, nos primeiros 15 minutos.

A eficiência do ataque das enzimas sobre as proteínas da carne bovina deu-se na seguinte ordem : primeiro a mistura, seguida da papaína e da tripsina e finalmente a protease microbiana. Os resultados apresentados possibilitam determinar, nas condições de trabalho, qual o grau de hidrólise mais

adequado em função do produto desejado.

Nos diferentes tratamentos, a temperatura da hidrólise teve uma variação de 50 a 56 °C. Segundo BARUFFALDI e cols. (10), essa faixa de temperatura possibilita um maior controle de contaminação microbiológica. A papaína e a protease microbiana possuem uma ótima atividade nessa faixa de temperatura (102).

PETERSEN (80) descreve que para uma dada protease, o grau de hidrólise é determinante sobre as propriedades como solubilidade, funcionalidade e sabor da proteína hidrolisada.

Enzimas proteolíticas de origem vegetal, tais como a ficina, a bromelina e a papaína, e, a tripsina de origem pancreática, atuam sobre o colágeno e elastina (80, 102). Segundo EL-GHARBAWI e WHITAKER (27) as enzimas microbianas possuem pouco ou nenhuma atividade sobre o colágeno, isso explica de modo claro a menor ação dessa enzima sobre a carne bovina.

Tabela 2 : Solubilidade e grau de hidrólise (GH) de proteínas da carne bovina submetida a hidrólise enzimática com papaína.

amostra	tempo (min)	°Brix	sólidos solúveis (g/100g)	GH (%)	temp. (°C)	valor pH
0	0	1,5	2,9	0,0	54	6,3
1	15	6,6	6,8	21,0	54	6,1
2	30	13,3	11,9	48,1	54	6,0
3	60	12,9	11,6	46,5	50	6,1
4	90	13,2	11,8	47,6	54	6,0
5	120	13,8	12,3	50,4	54	6,0
6	150	14,6	12,9	53,5	54	6,0
7	180	14,8	13,0	54,0	54	6,0

Tabela 3 : Solubilidade e grau de hidrólise (GH) de proteínas da carne bovina submetida a hidrólise enzimática com tripsina.

amostra	tempo	°Brix	sólidos solúveis	GH	temp.	valor pH
	(min)		(g/100g)	(%)	(°C)	
0	0	1,5	2,9	0,0	52	6,3
1	15	5,3	5,8	16,0	52	6,1
2	30	10,2	9,5	35,5	52	6,2
3	60	11,6	10,6	41,2	52	6,1
4	90	11,6	10,6	41,2	52	6,2
5	120	11,2	10,3	39,6	52	6,1
6	150	12,9	11,6	47,0	52	6,1
7	180	13,4	12,0	48,6	52	6,1

Tabela 4 : Solubilidade e grau de hidrólise (GH) de proteínas da carne bovina submetida a hidrólise enzimática com protease microbiana.

amostra	tempo (min)	^o Brix	sólidos solúveis (g/100g)	GH (%)	temp. (^o C)	valor pH
0	0	1,5	2,9	0,0	52	6,3
1	15	5,0	5,6	14,0	52	6,2
2	30	8,6	8,3	29,0	51	6,3
3	60	9,6	9,1	33,1	52	6,3
4	90	10,2	9,5	35,5	52	6,3
5	120	10,6	9,8	37,1	52	6,2
6	150	10,6	9,8	37,1	51	6,2
7	180	10,6	9,8	37,1	51	6,2

Tabela 5 : Solubilidade e grau de hidrólise (GH) de proteínas da carne bovina submetida a hidrólise enzimática com papaína, tripsina e protease microbiana, 2:1:2.

amostra	tempo	°Brix	sólidos solúveis	GH	temp.	valor pH
	(min)		(g/100g)	(%)	(°C)	
0	0	1,5	2,9	0,0	52	6,3
1	15	8,8	8,5	30,0	52	6,2
2	30	11,5	10,5	41,0	50	6,2
3	60	14,3	12,7	52,4	56	6,0
4	90	14,3	12,7	52,4	50	6,0
5	120	14,3	12,7	52,4	52	6,2
6	150	14,3	12,7	52,4	52	6,2
7	180	14,3	12,7	52,4	55	6,2

Figura 6 : Solubilidade e grau de hidrólise (GH) das proteínas da carne bovina submetida a hidrólise enzimática com papaína.

Figura 7 : Solubilidade e grau de hidrólise (GH) das proteínas da carne bovina submetida a hidrólise enzimática com tripsina.

Figura 8 : Solubilidade e grau de hidrólise (GH) das proteínas da carne bovina submetida a hidrólise enzimática com protease microbiana.

Figura 9 : Solubilidade e grau de hidrólise (GH) das proteínas da carne bovina submetida a hidrólise enzimática com mistura de papaína, tripsina e protease microbiana, 2:1:2.

Figura 10 : Solubilidade das proteínas de carne bovina submetida a hidrólise enzimática com papaina, tripsina, protease microbiana e mistura de enzimas (papaina, tripsina e protease microbiana, 2:1:2).

Figura 11 : Grau de hidrólise (GH) das proteínas de carne bovina submetida a hidrólise enzimática com papaína, tripsina, protease microbiana e mistura de enzimas (papaína, tripsina e protease microbiana, 2:1:2).

3 - Medidas da viscosidade

Amostras foram coletadas no decorrer da hidrólise da proteína da carne bovina com a mistura de enzimas, nos tempos 30, 60, 90, 120 e 150 minutos, e submetidas a medidas de viscosidade.

Aos resultados experimentais testou-se a aplicabilidade da lei da potência segundo RHA (86):

$$\log u = \log k + (n-1) \log (-dv/dl)$$

onde : u = viscosidade (poise)
 k = índice de consistência (dinas/cm^2)
 n = índice de comportamento de fluxo
 $(-dv/dl)$ = velocidade de cisalhamento (rad/s)

O modelo reológico relacionando o logaritmo da velocidade de cisalhamento e o logaritmo da viscosidade é conhecido por modelo de Ostwald-de Waele (42, 83). Foram, ainda, calculados os parâmetros "n" e "k".

A Tabela 6 representa a influência do tempo sobre os valores da viscosidade de hidrolisados de carne, medidas essas tomadas em diferentes velocidades angulares. Pela análise dos resultados observa-se uma queda nos valores logo nos primeiros minutos e a partir de 4 minutos a viscosidade se estabiliza.

A Figura 12 mostra o efeito do tempo sobre os valores da viscosidade para a amostra 1 (tempo de hidrólise 30 minutos, 30°C) em função da variação da velocidade angular.

Uma vez que os valores da viscosidade demonstraram-se concordantes entre si em função do tempo de leitura, foram tomadas as médias das viscosidades determinadas nos tempos 4, 5 e 6 minutos para o estudo do comportamento reológico dos hidrolisados de carne.

A Tabela 7 mostra o comportamento da viscosidade ao longo da hidrólise da proteína de carne bovina, medidas tomadas a 30 °C. Sob as condições experimentadas, as viscosidades aparentes das amostras variaram de 1,7 a 36,0 poises. Os resultados calculados com base na lei da potência podem ser vistos na Tabela 8.

A Tabela 9 relaciona os parâmetros da lei da potência calculados a partir dos dados da Tabela 8. A Figura 13 mostra o comportamento da viscosidade de hidrolisados protéicos de carne bovina. As viscosidades aparentes das amostras decrescem com o aumento da velocidade angular e não são significativamente influenciadas pelo tempo de hidrólise entre 30 e 180 minutos. Aos 90 minutos de hidrólise os valores máximos para a viscosidade foram atingidos.

A Tabela 10 mostra o comportamento da viscosidade ao longo da hidrólise da proteína da carne bovina, medidas tomadas a 60 °C. Sob as condições empregadas, as viscosidades aparentes das amostras variaram de 2,40 a 52,75 poises. Os resultados aplicando-se a lei da potência podem ser vistos na Tabela 11.

A Tabela 12 relaciona os parâmetros da lei da potência calculados a partir dos dados da Tabela 11. A Figura 14 mostra o

de carne bovina. As viscosidades aparentes das amostras decrescem com o aumento da velocidade angular, caracterizando um fluido não-Newtoniano, pseudoplástico.

Os índices de comportamento de fluxo, "n", obtidos na correlação linear entre os valores dos log das viscosidades e log das velocidades angulares nas temperaturas de 30 e 60 °C podem ser vistos, respectivamente, nas Tabelas 9 e 12. Os índices de comportamento de fluxo variaram de 0,08 a 0,38 na temperatura de 30 ° e de 0,13 a 0,58 a 60 °.

Segundo RAO (83) para fluidos pseudoplásticos, a magnitude de "n" é menor que a unidade e quanto menor o valor de "n", para pequenos incrementos nos valores de velocidade obtem-se grande variação nos valores da viscosidade.

A partir dos resultados obteve-se, ainda, o índice de consistência, "k", que variou de 7,55 a 15,22 dinas/cm² a 30 °C e 7,31 a 17,92 dinas/cm² a 60 °.

Na faixa de velocidades angulares ensaiadas o hidrolisado protéico de carne bovina comportou-se como um fluido não-Newtoniano, pseudoplástico.

Tabela 6 : Influência do tempo sobre os valores da viscosidade de hidrolisados protéicos de carne bovina, preparados com mistura de enzimas, amostra 1 (tempo de hidrólise 30 min, 30 °C) em função da variação da velocidade angular.

	velocidade angular (rad/s)				
	- 0,5	-0,2	0,1	0,5	0,8
	log visc. (poise)	log visc. (poise)	log visc. (poise)	log visc. (poise)	log visc. (poise)
tempo (min)					
1	1,52	1,27	1,11	0,85	0,62
2	1,46	1,24	1,08	0,80	0,60
3	1,42	1,21	1,07	0,78	0,59
4	1,40	1,20	1,05	0,77	0,58
5	1,38	1,18	1,03	0,75	0,60
6	1,38	1,19	1,03	0,74	0,58
10	1,35	1,19	0,99	0,74	0,50
15	1,38	1,25	1,03	0,76	0,51

Figura 12 : Influência do tempo sobre os valores da viscosidade de hidrolisados protéicos de carne bovina preparado com mistura de enzimas, amostra 1 (tempo de hidrólise 30 minutos, 30 °C) em função da variação da velocidade angular.

Tabela 7 : Comportamento da viscosidade ao longo da hidrólise da proteína da carne bovina preparada com mistura de enzimas em função da variação da velocidade angular. Temperatura de 30°C, média das leituras dos tempos 4, 5 e 6 minutos.

log -dv/dl (rad/s)	visc. amostra 1 (poise)	visc. amostra 2 (poise)	visc. amostra 3 (poise)	visc. amostra 4 (poise)	visc. amostra 5 (poise)
-0,5	24,33±0,58	28,50±0,50	36,00±0,00	18,83±0,29	27,00±1,43
-0,2	15,51±0,24	16,42±0,29	21,25±0,43	11,17±0,14	15,00±0,00
0,1	10,79±0,29	8,54±0,19	12,79±0,31	6,12±0,13	7,83±0,06
0,5	5,62±0,22	3,90±0,05	6,37±0,19	3,02±0,08	3,33±0,52
0,8	3,85±0,14	2,12±0,03	3,96±0,06	1,73±0,04	1,80±0,00

Tabela 8 : Comportamento da viscosidade de hidrolisados protéicos de carne bovina preparados com mistura de enzimas em função da variação da velocidade angular. Temperatura de 30 °C.

log -dv/dl (rad/s)	log visc. amostra 1 (poise)	log visc. amostra 2 (poise)	log visc. amostra 3 (poise)	log visc. amostra 4 (poise)	log visc. amostra 5 (poise)
-0,5	1,39	1,45	1,56	1,27	1,43
-0,2	1,19	1,22	1,33	1,05	1,18
0,1	1,03	0,93	1,11	0,79	0,89
0,5	0,75	0,59	0,80	0,48	0,52
0,8	0,59	0,33	0,60	0,24	0,26

Tabela 9 : Parâmetros da Lei da Potência para hidrolisados de carne preparados com mistura de enzimas. Temperatura de 30 °C.

	F(x)	r	n	k
amostra 1	-0,62 (x) + 1,08	0,998	0,38	11,91
amostra 2	-0,88 (x) + 1,02	0,9997	0,12	10,53
amostra 3	-0,74 (x) + 1,18	0,9996	0,26	15,22
amostra 4	-0,80 (x) + 0,88	0,9997	0,20	7,55
amostra 5	-0,91 (x) + 0,98	0,9998	0,08	9,64

F(x) - log viscosidade (poise)

r - coeficiente de correlação linear

n - índice de comportamento de fluxo

k - índice de consistência (dinas/cm²)

Figura 13 : Comportamento da viscosidade de hidrolisado protéico de carne preparado com mistura de enzimas em função do tempo de hidrólise e variação da velocidade angular. Temperatura de 30 °.

Tabela 10 : Comportamento da viscosidade ao longo da hidrólise da proteína de carne bovina preparada com mistura de enzimas em função da variação da velocidade angular. Temperatura de 60 °C, média das leituras dos tempos de 4, 5 e 6 minutos.

log -dv/dt (rad/s)	visc. amostra 1 (poise)	visc. amostra 2 (poise)	visc. amostra 3 (poise)	visc. amostra 4 (poise)	visc. amostra 5 (poise)
-0,5	27,33±0,76	17,67±0,76	52,75±3,18	15,00±0,00	34,33±1,15
-0,2	9,33±0,14	12,00±0,00	15,71±0,48	13,12±0,69	12,00±0,00
0,1	4,04±0,07	13,21±0,08	14,00±0,00	9,00±0,00	6,30±0,30
0,5	2,53±0,40	6,95±0,30	10,00±0,80	6,02±0,78	3,33±0,06
0,8	2,01±0,05	2,98±0,20	5,63±0,15	4,56±0,47	2,40±0,26

Tabela 11 : Comportamento da viscosidade de hidrolisados protéicos de carne bovina preparados com mistura de enzimas em função da variação da velocidade angular. Temperatura de 60 °C.

log -dv/dl (rad/s)	log visc. amostra 1 (poise)	log visc. amostra 2 (poise)	log visc. amostra 3 (poise)	log visc. amostra 4 (poise)	log visc. amostra 5 (poise)
-0,5	1,44	1,25	1,72	1,18	1,54
-0,2	0,97	1,08	1,20	1,12	1,08
0,1	0,61	1,12	1,15	0,95	0,80
0,5	0,40	0,84	1,00	0,78	0,52
0,8	0,30	0,47	0,75	0,66	0,38

Tabela 12 : Parâmetros da Lei da Potência para hidrolisados de carne preparados com mistura de enzimas. Temperatura de 60 °C.

	F(x)	r	n	k
amostra 1	-0,85 (x) + 0,86	0,92	0,15	7,31
amostra 2	-0,55 (x) + 1,03	0,87	0,45	10,70
amostra 3	-0,64 (x) + 1,25	0,87	0,36	17,92
amostra 4	-0,42 (x) + 1,00	0,99	0,58	9,91
amostra 5	-0,86 (x) + 0,98	0,95	0,13	9,67

F (x) - log viscosidade (poise)

r - coeficiente de correlação linear

n - índice de comportamento de fluxo

k - índice de consistência (dinas/cm²).

Figura 14 : Comportamento da viscosidade de hidrolisado protéico de carne preparado com mistura de enzimas em função do tempo de hidrólise e variação da velocidade angular. Temperatura de 60 °.

4 - Capacidade de emulsificação

Utilizou-se para esse estudo o hidrolisado protéico de carne bovina seco, obtido pelo tratamento com a mistura de enzimas.

Para verificar sobre a influência da quantidade de proteína solúvel na capacidade de emulsificação, foram preparadas inicialmente uma série de amostras nas quais a quantidade de proteína em 50 ml de solução variou de 2,2 a 55,2 mg por ml.

Foi encontrado que amostras de aproximadamente 5,0 mg/ml de proteína solúvel são adequadas à análise porque facilita a observação da emulsificação. Amostras contendo 15,0 mg/ml ou mais de proteína solúvel, formam emulsões firmes e pesadas que excedem a capacidade de emulsificação do equipamento.

Os resultados são mostrados na Tabela 13 e Figura 15. O coeficiente de correlação entre o mg/ml de proteína solúvel e o ml de óleo emulsionado foi $r = 0,996$. Isto indica que diferentes quantidades de proteína solúvel da mesma amostra do hidrolisado de carne estão relacionadas linearmente com a quantidade de óleo que pode ser emulsionada.

As Figuras 16 e 17 correspondem à fotomicrografias de emulsões tomadas após a adição de 50 ml de óleo às amostras contendo concentrações crescentes de proteína solúvel. As fotografias revelam : o diâmetro relativo dos glóbulos proteína-gordura na emulsão, a integridade e a espessura do filme de

proteína que circunda o glóbulo de gordura.

Observa-se claramente um aumento no número e uma diminuição no diâmetro dos glóbulos de gordura, conforme se aumentou o teor de proteínas solúveis nas amostras.

A Tabela 14 mostra o diâmetro e a frequência de distribuição dos glóbulos de gordura após emulsificação de hidrolisado protéico e óleo de soja observados num primeiro experimento.

As Figuras 18 a 23 mostram a distribuição média dos diâmetros dos glóbulos de gordura formados pela emulsificação em uma solução de hidrolisado de carne, apresentadas sob a forma de histogramas (11).

A Figura 18 mostra uma variação no diâmetro dos glóbulos de 0,40 a 1,33 mm com uma frequência máxima de 37,5 %. O diâmetro médio obtido foi de 0,92 mm.

A Figura 19 mostra que os diâmetros dos glóbulos de gordura variou de 0,18 a 1,49 mm e a frequência de 10 a 35 %. O diâmetro médio obtido foi de 0,92 mm.

Observa-se que o diâmetro médio obtido nas Figuras 18 e 19 não sofreu alteração. As distribuições de frequência na Figura 18 mostram que 70 % dos glóbulos possuem diâmetros maiores que 1,06 mm. A Figura 19 mostra que 70,0 % dos glóbulos possuem diâmetros numa faixa abaixo de 0,59 mm.

A Figura 20 mostra uma variação no diâmetro dos glóbulos de 0,13 a 0,99 mm e uma distribuição de frequência de 8,0 a 33,0 % . O diâmetro médio obtido foi de 0,43 mm.

A variação de 0,13 a 0,82 mm no diâmetro dos glóbulos de gordura pode ser observada na Figura 21. A distribuição da frequência variou de 8,0 a 44 % . e o diâmetro médio obtido foi de 0,43 mm.

A observação da Figura 20 permite a verificação de uma distribuição de 53,5 % dos glóbulos numa faixa de diâmetro acima de 0,41 mm. Na Figura 21 verifica-se uma distribuição de 67,0 % dos glóbulos com um diâmetro menor que 0,30 mm. Apesar de distintas distribuições obteve-se o mesmo diâmetro médio de 0,43 mm.

A Figura 22 mostra uma variação no diâmetro de 0,08 a 0,40 mm e uma frequência de 4,0 a 34 % . O diâmetro médio obtido foi de 0,24 mm.

A Figura 23 mostra a distribuição da frequência dos glóbulos de gordura variando de 4,0 a 48,0 % com um diâmetro na faixa de 0,08 a 0,27 mm. Obteve-se um diâmetro médio de 0,17 mm.

A partir dos resultados dos diâmetros médios calculados pelas Figuras 18 a 23, prepararam-se as Tabela 15 e Figura 24 que mostram a diâmetro médio dos glóbulos de gordura em função do aumento da concentração de sólidos solúveis.

O coeficiente de correlação entre a concentração de sólidos solúveis e o diâmetro dos glóbulos de gordura foi de $r = 0,9091$. Isto indica uma correlação linear entre o aumento da concentração de sólidos solúveis e a diminuição dos glóbulos de gordura formados durante a emulsificação.

Num segundo experimento, a concentração de sólidos solúveis variou de 5,9 a 12,8 g/100 g. A Tabela 16 mostra o diâmetro e a frequência de distribuição dos glóbulos de gordura após emulsificação de óleo de soja em hidrolisado de carne.

As Figuras 25 a 28 mostram a distribuição média dos diâmetros dos glóbulos de gordura formados pela emulsificação de hidrolisado de carne, apresentadas sob a forma de histogramas.

A Figura 25 mostra uma variação no diâmetro dos glóbulos de 0,33 a 1,42 mm e uma frequência de distribuição de 4,2 a 37,5 % . O diâmetro médio obtido foi de 1,05 mm. Observa-se uma distribuição de 75 % dos glóbulos numa faixa de diâmetro acima de 0,67 mm.

A Figura 26 mostra uma variação no diâmetro de 0,17 a 1,96 mm e a frequência de distribuição de 11,1 a 33,3 % . O diâmetro médio obtido foi de 0,96 mm. Observa-se uma distribuição de 88,9 % numa faixa abaixo de 0,82 mm.

Uma variação no diâmetro dos glóbulos de 0,17 a 1,43 mm pode ser vista na Figura 27. A distribuição dos glóbulos variou de 6,7 a 40,0 % sendo que 86,7 % encontrava-se numa faixa de 0,62 mm. O diâmetro médio foi de 0,72 mm.

A Figura 28 mostra que a faixa de distribuição dos diâmetros dos glóbulos variou de 2,1 a 31,9 % . A faixa de diâmetros obtida foi de 0,17 a 0,96 mm sendo que 51,0 % encontrou-se abaixo de 0,46 mm. O diâmetro médio foi de 0,62 mm.

O experimento 2 demonstra que o aumento da concentração de sólidos solúveis resultou num aumento do número e diminuição do diâmetro dos glóbulos de gordura das emulsões.

A partir dos resultados dos diâmetros médios calculados pelas Figuras 25 a 28, prepararam-se as Tabela 17 e Figura 29 que mostram o diâmetro médio dos glóbulos de gordura em função do aumento da concentração de sólidos solúveis.

A Figura 29 mostra o efeito do aumento da concentração de sólidos solúveis no diâmetro dos glóbulos. O coeficiente de correlação entre a concentração de sólidos solúveis e o diâmetro dos glóbulos foi de 0,9874. Isto demonstra uma linearidade entre o aumento da concentração de sólidos solúveis e a diminuição do diâmetro dos glóbulos de gordura formados após a emulsificação.

Sugeriu-se (53) que a proteólise aumenta o número de moléculas de peptídeos disponíveis na interface óleo-água, emulsificando mais óleo. Isto é refletido pelo aumento da capacidade de emulsificação. As relações entre estrutura protéica e emulsificação não são bem compreendidas (39).

Tabela 13 : Variação de proteína solúvel e capacidade de emulsificação de hidrolisado protéico de carne.

amostra	óleo emulsionado (ml)	proteína solúvel (mg/ml)	capacidade de emulsificação (ml óleo/100 mg proteína)	temperatura final (°C)
1	17,0	2,2	12,9	30
2	22,0	5,0	22,7	30
3	25,0	5,9	23,6	30
4	27,0	7,3	26,3	30
5	32,0	9,3	29,1	30
6	37,0	12,0	32,4	30

Figura 15 : Efeito da variação da concentração de sólidos solúveis na capacidade de emulsificação de hidrolisado protéico de carne.

Figura 16 : Fotomicrografias de emulsões de proteína hidrolisada de carne bovina em função do aumento da concentração de sólidos solúveis: a) amostra 1; b) amostra 2; c) amostra 3; d) amostra 4; e) amostra 5; f) amostra 6. Experimento 1. Aumento 40 x.

Figura 17 : Fotomicrografias de emulsões de proteína hidrolisada de carne bovina em função do aumento da concentração de sólidos solúveis: a) amostra 1; b) amostra 2; c) amostra 3; d) amostra 4. Experimento 2. Aumento 50 x.

Tabela 14 : Diâmetro e frequência dos glóbulos de gordura após emulsificação de hidrolisado protéico de carne e óleo de soja em função do aumento da concentração de sólidos solúveis. (Experimento 1)

amostra 1		amostra 2		amostra 3		amostra 4		amostra 5		amostra 6	
diam	freq	diam	freq	diam	freq	diam	freq	diam	freq	diam	freq
(mm)	(%)	(mm)	(%)	(mm)	(%)	(mm)	(%)	(mm)	(%)	(mm)	(%)
0,40	25,0	0,18	15,0	0,13	8,0	0,13	8,0	0,08	16,0	0,08	12,0
1,06	37,5	0,40	20,0	0,21	17,0	0,20	15,0	0,20	20,0	0,13	48,8
1,20	12,5	0,59	35,0	0,28	21,0	0,30	44,0	0,21	34,0	0,20	36,0
1,25	12,5	0,80	10,0	0,41	33,0	0,46	17,0	0,27	18,0	0,27	4,0
1,33	10,0	1,33	12,5	0,69	12,5	0,57	10,0	0,33	8,0		
		1,49	10,0	0,99	8,0	0,82	5,0	0,40	4,0

Figura 18 : Distribuição média dos diâmetros dos glóbulos de gordura formados pela emulsificação em uma solução de hidrolisado de carne a 5,4 g/100 g de sólidos solúveis.

Figura 19 : Distribuição média dos diâmetros dos glóbulos de gordura formados pela emulsificação em uma solução de hidrolisado de carne a 9,2 g/100 g de sólidos solúveis.

Figura 20 : Distribuição média dos diâmetros dos glóbulos de gordura formados pela emulsificação em uma solução de hidrolisado de carne a 18,4 g/100 g de sólidos solúveis.

Figura 21 : Distribuição média dos diâmetros dos glóbulos de gordura formados pela emulsificação em uma solução de hidrolisado de carne a 29,4 g/100 g de sólidos solúveis.

Figura 22 : Distribuição média dos diâmetros dos glóbulos de gordura formados pela emulsificação em uma solução de hidrolisado de carne a 36,8 g/100 g de sólidos solúveis.

Figura 23 : Distribuição média dos diâmetros dos glóbulos de gordura formados pela emulsificação em uma solução de hidrolisado de carne a 55,2 g/100 g de sólidos solúveis.

Tabela 15 : Concentração de sólidos solúveis e diâmetro médio dos glóbulos de gordura após a emulsificação. (Experimento 1)

amostra	concentração de sólidos solúveis (g/100g)	diâmetro dos glóbulos (mm)
1	5,4	0,92
2	9,2	0,92
3	18,4	0,43
4	29,4	0,43
5	36,8	0,24
6	55,2	0,17

Figura 24 : Efeito da concentração de sólidos solúveis no diâmetro dos glóbulos de gordura após emulsificação. Experimento 1.

Tabela 16 : Diâmetro e frequência dos glóbulos de gordura após emulsificação de hidrolisado protéico de carne e óleo de soja em função do aumento da concentração de sólidos solúveis. (Experimento 2)

amostra 1	amostra 2	amostra 3	amostra 4
diam freq	diam freq	diam freq	diam freq
(mm) (%)	(mm) (%)	(mm) (%)	(mm) (%)
0,33 4,2	0,17 11,1	0,17 20,0	0,17 2,1
0,45 8,3	0,38 16,7	0,41 26,7	0,31 23,4
0,53 12,5	0,51 27,8	0,62 40,0	0,46 25,5
0,67 20,8	0,82 33,3	0,83 6,7	0,63 31,9
0,94 37,5	1,96 11,1	1,43 6,7	0,79 8,5
1,42 16,8			0,96 8,5

Figura 25 : Distribuição média dos diâmetros dos glóbulos de gordura formados pela emulsificação em uma solução de hidrolisado de carne a 5,9 g/100 g de sólidos solúveis.

Figura 26 : Distribuição média dos diâmetros dos glóbulos de gordura formados pela emulsificação em uma solução de hidrolisado de carne a 7,9 g/100 g de sólidos solúveis.

Figura 27 : Distribuição média dos diâmetros dos glóbulos de gordura formados pela emulsificação em uma solução de hidrolisado de carne a 10,8 g/100 g de sólidos solúveis.

Figura 28 : Distribuição média dos diâmetros dos glóbulos de gordura formados pela emulsificação em uma solução de hidrolisado de carne a 12,8 g/100 g de sólidos solúveis.

Tabela 17 : Concentração de sólidos solúveis e diâmetro médio dos glóbulos de gordura após a emulsificação.
(Experimento 2)

amostra	concentração de sólidos solúveis (g/100g)	diâmetro dos glóbulos (mm)
1	5,9	1,05
2	7,9	0,96
3	10,8	0,72
4	12,8	0,62

Figura 29 : Efeito do aumento da concentração de sólidos solúveis no diâmetro dos glóbulos de gordura de emulsões de proteína hidrolisada de carne bovina.

5 - Fracionamento e identificação de aminoácidos.

A Tabela 18 apresenta os valores de Rf para os aminoácidos na sua forma livre presentes no filtrado. A observação dos cromatogramas permite identificar aminoácidos essenciais e não essenciais.

A Figura 30 representa os cromatogramas obtidos para diferentes hidrolisados em função do tempo de hidrólise. Observa-se a ocorrência de aumento da concentração de aminoácidos ao longo do tempo de hidrólise.

Tabela 18: Valores de Rf para aminoácidos, celulose :
n-butanol : acetona : água, 35 : 35 : 10 : 20.

aminoácido	Rf
leucina	8,96
fenilalanina	7,76
tirosina	6,40
alanina	5,44
treonina	4,48
glicina	3,76
histidina	2,08
cistina	1,20

Figura 30 : Cromatogramas de hidrolisados protéicos de carne em função do tempo de hidrólise, celulose : n-butanol : acetona : água , 35:35:10:20.

6 - Aminogramas

A Tabela 19 mostra o perfil de aminoácidos solúveis das proteínas da carne bovina antes da hidrólise enzimática. Os resultados revelam, pelos valores encontrados, que o suco da carne em si, sem nenhum tratamento, tem baixo teor de aminoácidos livres e totais. Os valores de aminoácidos totais, mesmo sendo pequenos, são muito maiores que aqueles correspondentes aos livres. No caso da metionina, por exemplo, os totais chegam a ser 60 vezes maiores, os da leucina e os da isoleucina chegam a 40 vezes.

Da comparação entre os teores de totais com os da FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION^{Bf} (31) resulta o seguinte: o aminoácido encontrado em maior quantidade é a histidina, correspondendo a 0,0946 g/100 ml, equivalendo dizer que no suco de carne existe 16 % desse componente. É interessante notar a presença de triptofano livre no suco e, ainda, a lisina é o essencial presente em maior quantidade.

A Tabela 20 confronta os resultados percentuais de aminoácidos, livres e totais, da amostra sem tratamento enzimático, com o perfil padrão da carne estabelecido pela FAO/WHO. Vê-se a histidina correspondendo a 221 % do valor, mostrando indiscutivelmente a alta solubilidade desse componente. A seguir, tem-se a prolina e a valina com valores próximos aos 118 % , a tirosina com 117 % e a alanina com 113 %.

Entre os 110 e 90 % encontramos na ordem decrescente glicina, metionina, serina, ácido aspártico, leucina, lisina e treonina. Abaixo dos 90 % os demais: fenilalanina, isoleucina, ácido glutâmico, arginina e cistina.

Os aminoácidos essenciais, com exceção da valina com 118 % e da metionina com 107 %, estão com seus teores sempre abaixo dos 100 % quando comparados aos dados da FAO.

Na Tabela 21 tem-se as massas de aminoácidos livres e totais aos 30 e 180 minutos de hidrólise da proteína de carne bovina pela papaína. As somatórias mostram um aumento significativo nos valores de solúveis quando se compara com as somatórias da Tabela 19. O teor dos livres e dos totais aumenta aproximadamente sete vezes e meia em apenas 30 minutos de processo e, após os 180 minutos, o teor de solúveis aumenta em 11 vezes para os livres e 9 vezes para os totais.

Analisando os valores tem-se a arginina aparecendo com maior teor nos 30 minutos subsequentes de hidrólise, seguida pela alanina, prolina, ácido glutâmico e histidina. Aos 180 minutos a situação praticamente não se altera aparecendo no solúvel pela ordem decrescente, quando comparados esse valores aos dados da FAO a alanina, arginina, glicina, ácido glutâmico e histidina em percentuais variando entre os 78 até os 73 % .

Considerando-se os valores percentuais dos livres e totais encontrados aos 30 e 180 minutos (Tabela 22) tem-se os aminoácidos mais facilmente liberados nos primeiros 30 minutos: a arginina, alanina, prolina, ácido glutâmico e histidina. Os que

apareceram em menores percentuais foram a isoleucina, fenilalanina e por último a 1/2 cistina.

Nos 180 minutos os resultados se mantiveram para os cinco primeiros, tendo ocorrido apenas uma inversão da arginina com a alanina. No caso dos menores teores também as posições foram mantidas. Cabendo ressaltar o aumento de 100 % da 1/2 cistina.

Esta Tabela mostra ainda os valores percentuais para o tratamento com papaína, tornando evidentes as variações sofridas na composição, pois o conjunto de componentes sofre mudanças em virtude da alteração dos teores relativos de cada aminoácido nos solúveis.

Comparando-se os resultados das Tabelas 20 e 22 tem-se destacadas as variações dos teores percentuais e conseqüentemente as mudanças de posição na ordem crescente ou decrescente desses. Assim, a histidina que no tempo 0, isto é, na carne sem tratamento, aparecia em maior quantidade, tem uma diminuição acentuada em seu percentual aos 30 minutos, descendo para o quinto lugar, onde manteve-se nos 180 minutos.

Esses raciocínios podem ser feitos para cada um dos componentes. Porém, no conjunto pode-se dizer que mesmo tendo havido uma maior solubilização da carne não ocorreu um enriquecimento do produto em aminoácidos essenciais. No início os essenciais encontravam-se no 3, 7, 10, 11, 12, 13 e 14 lugares na ordem decrescente. Passaram, após transcorrerem os primeiros 30 minutos, para o 8, 9, 10, 12, 13, 15 e 16 lugares. Depois dos

180 minutos ocuparam os lugares 8, 9, 10, 11, 12, 15 e 17. Essas mudanças não mostram uma melhoria nas colocações, mas o inverso, porque há um deslocamento para as posições finais.

Os resultados percentuais para os totais aos 180 minutos estão oscilando desde os 79 % para a fenilalanina até os 116 % para a alanina.

Os aminoácidos encontrados em teores inferiores aos 90 %, após os 180 minutos de ataque, quando relacionados com o padrão FAO pela ordem decrescente, são: prolina, tirosina, isoleucina, 1/2 cistina e fenilalanina. Apenas a isoleucina e a fenilalanina são essenciais. Por outro lado, cinco aminoácidos ultrapassaram a relação dos 108 % : alanina, arginina, glicina, ácido glutâmico e histidina, entretanto nenhum desses é essencial.

Segundo BELTZ (14) o triptofano é completamente destruído durante a hidrólise ácida de uma proteína. Isso ocorre no preparo da amostra a ser injetada no equipamento.

Na Tabela 23 tem-se as massas de aminoácidos livres e totais aos 30 e 180 minutos de hidrólise da proteína de carne bovina pela tripsina. As somatórias mostram um aumento significativo nos valores de solúveis, quando se compara com as somatórias da Tabela 19. O teor dos livres e dos totais aumenta aproximadamente de quatro a seis vezes, respectivamente, em apenas 30 minutos de processo, e após os 180 minutos o teor de solúveis aumenta em 8 vezes para os livres e 7 vezes para os totais.

Analisando os valores, tem-se a arginina aparecendo com maior teor nos 30 minutos de hidrólise, seguida pelo ácido glutâmico, histidina, 1/2 cistina e alanina. Aos 180 minutos a situação altera-se aparecendo no solúvel pela ordem decrescente, quando comparados esses valores aos dados da FAO, o ácido glutâmico, alanina, glicina, serina e histidina em percentuais variando entre 61 e 54 % do valor.

Considerando-se os valores percentuais dos livres e totais encontrados aos 30 e 180 minutos (Tabela 24) tem-se os aminoácidos mais facilmente liberados referente nos primeiros 30 minutos: arginina, ácido glutâmico, histidina, 1/2 cistina e alanina. Os que apareceram em menores percentuais foram a tirosina, prolina e valina.

Aos 180 minutos os resultados não se mantiveram para os cinco primeiros: ácido glutâmico, alanina, glicina, serina e histidina, tendo portanto havido aparecimento de novos aminoácidos. Os menores teores foram para a 1/2 cistina, isoleucina, fenilalanina e valina.

Esta Tabela mostra os valores percentuais para o tratamento com tripsina, tornando evidentes as variações sofridas na composição, pois muda-se o conjunto de componentes em virtude da alteração dos teores relativos de cada aminoácido no conjunto dos solúveis.

Comparando-se os resultados das Tabelas 20 e 24 tem-se destacadas as variações dos teores percentuais e conseqüentemente as mudanças de posição na ordem crescente ou decrescente destes.

Assim, a histidina que no tempo 0, isto é na carne sem tratamento, aparecia em maior quantidade, tem uma queda acentuada em seu percentual aos 30 minutos, tendo baixado para o terceiro lugar, e aos 180 minutos passou para a quinta posição.

A arginina, por sua vez, apresentou um crescimento bastante grande, pois no tempo zero estava presente entre os totais num teor de 77 %. Durante os primeiros 30 minutos esse passa para os 129 %, mostrando claramente especificidade da enzima para esse aminoácido, apesar disso no caso da lisina esse fenômeno não chega a ser tão evidente.

Esses raciocínios podem ser feitos para cada um dos componentes. Porém, no conjunto pode-se dizer que mesmo tendo havido uma maior solubilização da carne não ocorre um enriquecimento do produto em aminoácidos essenciais. No início os essenciais encontravam-se no 3, 7, 10, 11, 12, 13 e 14 lugares na ordem decrescente. Passaram, após transcorrerem os primeiros 30 minutos, para o 8, 9, 10, 12, 13, 14 e 15 lugares. Depois dos 180 minutos ocuparam os lugares 9, 10, 11, 13, 14, 15 e 16. Essas mudanças não mostram uma melhoria nas colocações.

Os resultados percentuais para os totais aos 180 minutos estão oscilando desde os 75 % para a isoleucina até os 117 % para o ácido glutâmico. Os aminoácidos encontrados em teores inferiores aos 90 %, após os 180 minutos de ataque, quando relacionados com o padrão FAO pela ordem decrescente, são: metionina, valina, fenilalanina e isoleucina. É interessante notar o fato de todos serem essenciais. Por outro lado, três

aminoácidos ultrapassaram a relação dos 108 % : ácido glutâmico, alanina e glicina, nenhum essencial.

Na Tabela 25 tem-se as massas de aminoácidos livres e totais aos 30 e 180 minutos de hidrólise da proteína de carne bovina pela protease microbiana. As somatórias mostram um aumento significativo nos valores de solúveis, quando se compara com as somatórias da Tabela 19. O teor dos livres e dos totais aumenta aproximadamente cinco vezes em apenas 30 minutos de processo e, após os 180 minutos o teor de solúveis aumenta em 9,3 vezes para os livres e 5,6 vezes para os totais.

Analisando os valores, tem-se a histidina novamente aparecendo com grande teor nos 30 minutos subsequentes de hidrólise. Aos 180 minutos de hidrólise a situação altera-se, aparecendo no solúvel o ácido glutâmico num teor equivalente a 56 % do valor FAO. Esse é seguido de perto pela arginina, histidina, alanina e lisina com aproximadamente 50 %. É importante lembrar que de todos estes, apenas a lisina é essencial.

Considerando-se os valores percentuais dos livres e totais encontrados aos 30 e 180 minutos (Tabela 26) tem-se os aminoácidos mais facilmente liberados nos primeiros 30 minutos: a leucina, a histidina, a alanina, e a fenilalanina, pois apareceram de imediato em teores superiores aos 10 % e somente a glicina e a tirosina não alcançaram os 2,5 % .

Nos 180 minutos os resultados se mantiveram para a leucina , alanina e fenilalanina e um pouco menos para a histidina.

Esta Tabela mostra os valores percentuais para o tratamento com neutrase, tornando evidentes as variações sofridas na composição, pois muda-se o conjunto de componentes em virtude da alteração dos teores relativos de cada aminoácido no conjunto dos solúveis.

Comparando-se os resultados das Tabelas 20 e 26 tem-se destacadas as variações dos teores percentuais e conseqüentemente as mudanças de posição na ordem crescente ou decrescente desses. Assim a histidina que no tempo 0, isto é, na carne sem tratamento, aparecia em maior quantidade, tem uma diminuição acentuada em seu percentual aos 30 minutos porém continuou mantendo-se ainda em primeiro lugar. Já aos 180 minutos aparece em terceiro lugar.

Esses raciocínios podem ser feitos para cada um dos componentes. Porém, no conjunto pode-se dizer que mesmo tendo havido uma maior solubilização da carne não ocorreu um enriquecimento do produto em aminoácidos essenciais. No início esses encontravam-se no 3, 7, 10, 11, 12, 13 e 14 lugares na ordem decrescente. Passaram, após transcorrerem os primeiros 30 minutos, para o 3, 5, 9, 13, 14, 15 e 17. Depois dos 180 minutos ocuparam os lugares 5, 7, 10, 11, 13, 15 e 16 essas mudanças não mostram uma melhoria nas colocações porém apenas uma manutenção de posições.

Os resultados percentuais estão oscilando desde os 69 % para a fenilalanina até os 122 % para o ácido glutâmico. Os aminoácidos encontrados em teores inferiores aos 92 %, após

os 180 minutos de ataque, quando relacionados com o padrão FAO pela ordem decrescente, são: treonina, glicina, valina, tirosina, isoleucina e fenilalanina. Somente a tirosina e a glicina não são essenciais. Por outro lado, apenas quatro aminoácidos ultrapassaram a relação dos 108 % : alanina, histidina, arginina e ácido glutâmico, entretanto nenhum desses é essencial.

Na Tabela 27 tem-se as massas de aminoácidos livres e totais aos 30 e 180 minutos de hidrólise da proteína de carne bovina pela mistura de enzimas. As somatórias mostram um aumento significativo nos valores de solúveis, quando se compara com as somatórias da Tabela 19. O teor dos livres e dos totais aumenta aproximadamente sete vezes e oito vezes e meia em apenas 30 minutos de processo e, após os 60 minutos o teor de solúveis aumenta em 12 vezes para os livres e 9 vezes para os totais.

Analisando os valores, tem-se a arginina aparecendo com maior teor nos 30 minutos subsequentes de hidrólise, seguida pela lisina, histidina, ácido glutâmico e alanina. Aos 60 minutos a situação praticamente não se altera, aparecendo no solúvel pela ordem decrescente: arginina, ácido glutâmico, lisina, alanina e histidina em teores variando entre os 84 % até os 27 % do valor FAO.

Considerando-se os valores percentuais dos livres e totais encontrados aos 30 e 60 minutos (Tabela 28) tem-se os aminoácidos mais facilmente liberados referente aos 30 minutos: a arginina, lisina, histidina, ácido glutâmico e alanina. Os que apareceram em menores percentuais foram a serina, tirosina,

isoleucina, e por último a 1/2 cistina.

Nos 60 minutos os resultados se mantiveram para os cinco primeiros, tendo ocorrido apenas uma inversão de posição entre eles. No caso dos menores teores também as posições praticamente se mantiveram tendo aparecido a fenilalanina no lugar da serina. Cabe ressaltar o aumento de 100 % no caso da 1/2 cistina.

Esta Tabela mostra os valores percentuais para o tratamento com a mistura de enzimas tornando evidentes as variações sofridas na composição, pois muda-se o conjunto de componentes em virtude da alteração dos teores relativos de cada aminoácido no balanço de massas dos solúveis.

Comparando-se os resultados das Tabelas 20 e 28 tem-se destacadas as variações dos teores percentuais e consequentemente as mudanças de posição na ordem crescente ou decrescente destes. Assim, a histidina que no tempo 0, isto é, na carne sem tratamento, aparecia em maior quantidade, tem uma diminuição em seu percentual aos 30 minutos. Aos 60 minutos em virtude de ter mantido seu percentual, passa terceiro para o quinto lugar.

Esses raciocínios podem ser feitos para cada um dos componentes. Porém no conjunto pode-se dizer que houve uma maior solubilização da carne e também um enriquecimento do produto em aminoácidos essenciais. No início os essenciais encontravam-se no 3, 7, 10, 11, 12, 13 e 14 lugares na ordem decrescente. Passaram, após transcorrerem os primeiros 30 minutos, para o 2, 7, 10, 11, 13, 14 e 16 lugares. Depois dos 60

minutos ocuparam os lugares 4, 9, 10, 12, 13, 15 e 16. Essas mudanças melhoriam as colocações, destacando-se a lisina.

Os resultados percentuais para os totais aos 60 minutos estão oscilando desde os 41 % para a 1/2 cistina até os 127 % para a arginina. A disponibilidade dos aminoácidos está intimamente relacionada a sua posição na molécula e ao fato de suas ligações serem acessíveis ao ataque enzimático.

Os aminoácidos encontrados em teores inferiores aos 90 %, após os 60 minutos de ataque, quando relacionados com o padrão FAO pela ordem decrescente, são: leucina, valina, tirosina, fenilalanina e 1/2 cistina. Apenas a tirosina e a 1/2 cistina não são essenciais. Por outro lado, quatro aminoácidos ultrapassaram a relação dos 100 % : arginina, ácido glutâmico, lisina e alanina. Muito importante é a presença da lisina.

O produto de reação feita com a mistura de enzimas, depois de ter sido seco em estufa, sofreu uma extração de gorduras e dos solúveis resultando um resíduo, o qual foi também analisado. Os resultados encontram-se na Tabela 29, sendo bastante baixos. O maior deles é 0,53 % para a arginina e os demais são ainda inferiores.

Uma vez discutidos os tratamentos, se depreende que entre as enzimas testadas, a papaína foi aquela a apresentar no final do processo um maior teor de solúveis. Aos 30 minutos 9,17 g/100 ml e aos 180 minutos 11,46 g/100 ml. A seguir, vem a tripsina com 7,47 g/100 ml de solúveis aos 30 minutos e 8,85 g/100 ml aos 180 minutos.

A mistura, feita a partir dessas três enzimas, mostrou-se muito eficiente, pois aos 30 minutos seus solúveis eram 10,20 g/100 ml superando, portanto, a papaina. Os resultados referentes aos 60 minutos estão praticamente iguais aos da papaina aos 180 minutos.

O tratamento em que houve um enriquecimento do produto em aminoácidos essenciais foi com a mistura de enzimas, pois evidencia-se nos solúveis um aumento nesses teores. No tratamento com papaina os resultados mostram ter havido um deslocamento para o lado mais baixo, ou seja uma diminuição nos teores de essenciais. Com a tripsina a queda é um pouco menor.

Em todos os tratamentos enzimáticos expostos nota-se nos totais o valor zero correspondente ao triptofano. Isso é devido ao fato de o triptofano ser decomposto durante a hidrólise ácida.

Alguma semelhança entre todos eles é vista quando se verifica ser a arginina o aminoácido mais facilmente liberado e a presença da alanina, do ácido glutâmico e da histidina entre a segunda e quarta posições.

A fenilalanina ocupa em todos os tratamentos as últimas posições entre os aminoácidos analisados.

Tabela 19 : Teor de aminoácidos livres e totais em amostras solúveis de proteína de carne bovina.

aminoácidos	livres		totais		FAO/WHO
		(g/100ml)		(g/100ml)	(g/100g)
lisina	*	0,0031		0,1024	1,5730
histidina		0,0312		0,0946	0,6030
arginina		0,0020		0,0610	1,1118
triptofano	*	0,0067		0,0000	0,0000
ac. aspártico		0,0008		0,1071	1,5900
treonina	*	0,0000		0,0523	0,8120
serina		0,0089		0,0512	0,7130
ac. glutâmico		0,0057		0,1578	2,7030
prolina		0,0016		0,0561	0,6680
glicina		0,0027		0,0659	0,8600
alanina		0,0129		0,0826	1,0330
1/2 cistina		0,0000		0,0118	0,2260
valina	*	0,0020		0,0742	0,8860
metionina	*	0,0006		0,0364	0,4780
isoleucina	*	0,0012		0,0511	0,8520
leucina	*	0,0022		0,0959	1,4350
tirosina		0,0007		0,0530	0,6370
fenilalanina	*	0,0014		0,0483	0,7780
somatória		0,0837		1,2017	16,9588

* aminoácidos essenciais

Tabela 20 : Teor de aminoácidos livres e totais em amostras solúveis de proteína de carne bovina em base 100.

aminoácidos		livres	totais	FAO/WHO
		(%)	(%)	(%)
lisina	*	3,70	8,52	9,28
histidina		37,28	7,87	3,56
arginina		2,39	5,08	6,56
triptofano	*	8,00	0,00	0,00
ac. aspártico		0,96	8,91	9,38
treonina	*	0,00	4,35	4,79
serina		10,63	4,26	4,20
ac. glutâmico		6,81	13,13	15,94
prolina		1,91	4,67	3,94
glicina		3,23	5,48	5,07
alanina		15,41	6,87	6,09
1/2 cistina		0,00	0,98	1,33
valina	*	2,39	6,17	5,22
metionina	*	0,72	3,03	2,82
isoleucina	*	1,43	4,25	5,02
leucina	*	2,63	7,98	8,46
tirosina		0,84	4,41	3,76
fenilalanina	*	1,67	4,02	4,59
somatória		100,00	100,00	100,00

* aminoácidos essenciais

Tabela 21 : Teor de aminoácidos livres e totais em amostras
hidrolisadas pela papaína por 30 e 180 minutos.

aminoácidos		30 min livres (g/100ml)	30 min totais (g/100ml)	180 min livres (g/100ml)	180 min totais (g/100ml)	FAO/WHO (g/100g)
lisina	*	0,0603	0,8241	0,1177	1,0617	1,5730
histidina		0,0775	0,3438	0,0847	0,4383	0,6030
arginina		0,0618	0,7085	0,1077	0,8436	1,1118
triptofano	*	0,0056	0,0000	0,0130	0,0000	0,0000
ac. aspártico		0,0000	0,8907	0,0033	1,1258	1,5900
treonina	*	0,0000	0,4210	0,0000	0,5413	0,8120
serina		0,0356	0,3671	0,0359	0,4908	0,7130
ac. glutâmico		0,0249	1,5603	0,0609	1,9871	2,7030
prolina		0,0072	0,4166	0,0090	0,4068	0,6680
glicina		0,0156	0,4865	0,0358	0,6348	0,8600
alanina		0,0618	0,6523	0,1192	0,8096	1,0330
1/2 cistina		0,0000	0,0612	0,0000	0,1223	0,2260
valina	*	0,0144	0,4485	0,0285	0,5765	0,8860
metionina	*	0,0195	0,2448	0,0583	0,3012	0,4780
isoleucina	*	0,0122	0,3697	0,0306	0,4634	0,8520
leucina	*	0,0730	0,7449	0,1074	0,8771	1,4350
tirosina		0,0139	0,2973	0,0449	0,3659	0,6370
fenilalanina	*	0,0248	0,3336	0,0707	0,4169	0,7780
somatória		0,5081	9,1709	0,9276	11,4631	16,9588

* aminoácidos essenciais

Tabela 22 : Teor de aminoácidos livres e totais em amostras hidrolisadas pela papaína por 30 e 180 minutos e em base 100.

aminoácidos		30 min livres (%)	30 min totais (%)	180 min livres (%)	180 min totais (%)	FAO/WHO (%)
lisina	*	11,87	8,99	12,69	9,26	9,28
histidina		15,25	3,75	9,13	3,82	3,56
arginina		12,16	7,73	11,61	7,36	6,56
triptofano	*	1,10	0,00	1,40	0,00	0,00
ac.aspártico		0,00	9,71	0,36	9,82	9,38
treonina	*	0,00	4,59	0,00	4,72	4,79
serina		7,01	4,00	3,87	4,28	4,20
ac.glutâmico		4,90	17,01	6,57	17,33	15,94
prolina		1,42	4,54	0,97	3,55	3,94
glicina		3,07	5,30	3,86	5,54	5,07
alanina		12,16	7,11	12,85	7,06	6,09
1/2 cistina		0,00	0,67	0,00	1,07	1,33
valina	*	2,83	4,89	3,07	5,03	5,22
metionina	*	3,84	2,67	6,29	2,63	2,82
isoleucina	*	2,40	4,03	3,30	4,04	5,02
leucina	*	14,37	8,12	11,58	7,65	8,46
tirosina		2,74	3,24	4,84	3,19	3,76
fenilalanina	*	4,88	3,64	7,62	3,64	4,59
somatória		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

* aminoácidos essenciais

Tabela 23 : Teor de aminoácidos livres e totais em amostras
hidrolisadas pela tripsina por 30 e 60 minutos.

aminoácidos		30 min	30 min	180 min	180 min	FAO/WHO
		livres	totais	livres	totais	
		(g/100ml)	(g/100ml)	(g/100ml)	(g/100ml)	
lisina	*	0,0359	0,6917	0,0830	0,8110	1,5730
histidina		0,0542	0,2969	0,0652	0,3288	0,6030
arginina		0,0285	0,6314	0,0713	0,5975	1,1118
triptofano	*	0,0000	0,0000	0,0056	0,0000	0,0000
ac.aspártico		0,0056	0,7038	0,0127	0,8569	1,5900
treonina	*	0,0000	0,3239	0,0000	0,4210	0,8120
serina		0,0320	0,3175	0,0422	0,3980	0,7130
ac.glutâmico		0,0231	1,3558	0,0422	1,6529	2,7030
prolina		0,0042	0,2434	0,0072	0,3487	0,6680
glicina		0,0086	0,3515	0,0102	0,4927	0,8600
alanina		0,0511	0,4844	0,0791	0,6184	1,0330
1/2 cistina		0,0000	0,1098	0,0000	0,0000	0,2260
valina	*	0,0142	0,3273	0,0281	0,3991	0,8860
metionina	*	0,0155	0,1802	0,0391	0,2259	0,4780
isoleucina	*	0,0122	0,3169	0,0286	0,3310	0,8520
leucina	*	0,0365	0,5942	0,1028	0,7117	1,4350
tirosina		0,0134	0,2189	0,0341	0,3087	0,6370
fenilalanina	*	0,0189	0,3193	0,0505	0,3439	0,7780
somatória		0,3539	7,4669	0,7019	8,8462	16,9588

* aminoácidos essenciais

Tabela 24 : Teor de aminoácidos livres e totais em amostras hidrolisadas pela tripsina por 30 e 180 minutos em base 100.

aminoácidos		30 min	30 min	180 min	180 min	FAO/WHO
		livres	totais	livres	totais	
		(%)	(%)	(%)	(%)	
lisina	*	10,14	9,26	11,83	9,17	9,28
histidina		15,32	3,98	9,29	3,72	3,56
arginina		8,05	8,46	10,16	6,75	6,56
triptofano	*	0,00	0,00	0,80	0,00	0,00
ac. aspártico		1,58	9,43	1,81	9,69	9,38
treonina	*	0,00	4,34	0,00	4,76	4,79
serina		9,04	4,25	6,01	4,50	4,20
ac. glutâmico		6,53	18,16	6,01	18,68	15,94
prolina		1,19	3,26	1,03	3,94	3,94
glicina		2,43	4,71	1,45	5,57	5,07
alanina		14,44	6,49	11,27	6,99	6,09
1/2 cistina		0,00	1,47	0,00	0,00	1,33
valina	*	4,01	4,38	4,00	4,51	5,22
metionina	*	4,38	2,41	5,57	2,55	2,82
isoleucina	*	3,45	4,24	4,07	3,74	5,02
leucina	*	10,31	7,96	14,65	8,05	8,46
tirosina		3,79	2,93	4,86	3,49	3,76
fenilalanina*		5,34	4,28	7,19	3,89	4,59
somatória		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

* aminoácidos essenciais

Tabela 25 : Teor de aminoácidos livres e totais em amostras hidrolisadas pela protease microbiana por 30 e 180 minutos.

aminoácidos		30 min livres (g/100ml)	30 min totais (g/100ml)	180 min livres (g/100ml)	180 min totais (g/100ml)	FAO/WHO (g/100g)
lisina	*	0,0180	0,5856	0,0449	0,7747	1,5730
histidina		0,0623	0,2833	0,0655	0,3131	0,6030
arginina		0,0178	0,4490	0,0414	0,5975	1,1118
triptofano	*	0,0000	0,0000	0,0067	0,0000	0,0000
ac. aspártico		0,0000	0,4845	0,0022	0,7393	1,5900
treonina	*	0,0000	0,2188	0,0000	0,3458	0,8120
serina		0,0252	0,2285	0,0344	0,3316	0,7130
ac. glutâmico		0,0145	0,9450	0,0229	1,5229	2,7030
prolina		0,0108	0,2257	0,0184	0,3196	0,6680
glicina		0,0080	0,2982	0,0101	0,3506	0,8600
alanina		0,0580	0,3975	0,0825	0,5285	1,0330
1/2 cistina		0,0000	0,0532	0,0000	0,0000	0,2260
valina	*	0,0249	0,2454	0,0633	0,3548	0,8860
metionina	*	0,0128	0,1916	0,0360	0,2259	0,4780
isoleucina	*	0,0226	0,2083	0,0650	0,2979	0,8520
leucina	*	0,0822	0,4831	0,2084	0,6620	1,4350
tirosina		0,0059	0,1792	0,0148	0,2287	0,6370
fenilalanina*		0,0388	0,1786	0,0582	0,2501	0,7780
somatória		0,4018	5,6555	0,7747	7,8430	16,9588

* aminoácidos essenciais

Tabela 26 : Teor de aminoácidos livres e totais em amostras hidrolisadas pela protease microbiana por 30 e 180 minutos em base 100.

aminoácidos		30 min livres (%)	30 min totais (%)	180 min livres (%)	180 min totais (%)	FAO/WHO (%)
lisina	*	4,48	10,35	5,80	9,88	9,28
histidina		15,51	5,01	8,45	3,99	3,56
arginina		4,43	7,94	5,34	7,62	6,56
triptofano	*	0,00	0,00	0,86	0,00	0,00
ac. aspártico		0,00	8,57	0,28	9,43	9,38
treonina	*	0,00	3,87	0,00	4,41	4,79
serina		6,27	4,04	4,44	4,23	4,20
ac. glutâmico		3,61	16,71	2,96	19,42	15,94
prolina		2,69	3,99	2,38	4,07	3,94
glicina		1,99	5,27	1,30	4,47	5,07
alanina		14,44	7,03	10,65	6,74	6,09
1/2 cistina		0,00	0,94	0,00	0,00	1,33
valina	*	6,20	4,34	8,17	4,52	5,22
metionina	*	3,19	3,39	4,65	2,88	2,82
isoleucina	*	5,62	3,68	8,39	3,80	5,02
leucina	*	20,46	8,54	26,90	8,44	8,46
tirosina		1,47	3,17	1,91	2,92	3,76
fenilalanina*		9,66	3,16	7,51	3,19	4,59
somatória		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

* aminoácidos essenciais

Tabela 27 : Teor de aminoácidos livres e totais em amostras
hidrolisadas pela mistura por 30 e 60 minutos.

aminoácidos		30 min livres (g/100ml)	30 min totais (g/100ml)	60 min livres (g/100ml)	60 min totais (g/100ml)	FAO/WHO (g/100g)
lisina	*	0,0930	1,0762	0,1696	1,1262	1,5730
histidina		0,0380	0,3926	0,0733	0,4281	0,6030
arginina		0,0778	0,8287	0,1163	0,9378	1,1118
triptofano	*	0,0060	0,0000	0,0067	0,0000	0,0000
ac. aspártico		0,0025	0,9978	0,0029	1,1088	1,5900
treonina	*	0,0000	0,4680	0,0000	0,5311	0,8120
serina		0,0214	0,3939	0,0370	0,4598	0,7130
ac. glutâmico		0,0312	1,7609	0,0374	1,9868	2,7030
prolina		0,0037	0,3966	0,0069	0,4551	0,6680
glicina		0,0172	0,5173	0,0260	0,5684	0,8600
alanina		0,0530	0,6569	0,1131	0,7382	1,0330
1/2 cistina		0,0000	0,0439	0,0000	0,0611	0,2260
valina	*	0,0174	0,4743	0,0230	0,5123	0,8860
metionina	*	0,0294	0,2885	0,0391	0,3137	0,4780
isoleucina	*	0,0201	0,3963	0,0267	0,4192	0,8520
leucina	*	0,1357	0,8005	0,2381	0,8494	1,4350
tirosina		0,0063	0,3176	0,0396	0,3658	0,6370
fenilalanina*		0,0360	0,3893	0,0492	0,3890	0,7780
somatória		0,5887	10,1993	1,0049	11,2508	16,9588

* aminoácidos essenciais

Tabela 28 : Teor de aminoácidos livres e totais em amostras hidrolisadas pela mistura por 30 e 60 minutos em base 100.

aminoácidos		30 min livres (%)	30 min totais (%)	60 min livres (%)	60 min totais (%)	FAO/WHO (%)
lisina	*	15,8	10,6	16,9	10,0	9,3
histidina		6,5	3,8	7,3	3,8	3,6
arginina		13,2	8,1	11,6	8,3	6,6
triptofano	*	1,0	0,0	0,7	0,0	0,0
ac. aspártico		0,4	9,8	0,3	9,9	9,4
treonina	*	0,0	4,6	0,0	4,7	4,8
serina		3,6	3,9	3,7	4,1	4,2
ac. glutâmico		5,3	17,3	3,7	17,7	15,9
prolina		0,6	3,9	0,7	4,0	3,9
glicina		2,9	5,1	2,6	5,1	5,1
alanina		9,0	6,4	11,3	6,6	6,1
1/2 cistina		0,0	0,4	0,0	0,5	1,3
valina	*	3,0	4,7	2,3	4,6	5,2
metionina	*	5,0	2,8	3,9	2,8	2,8
isoleucina	*	3,4	3,9	2,7	3,7	5,0
leucina	*	23,1	7,8	23,7	7,5	8,5
tirosina		1,1	3,1	3,9	3,3	3,8
fenilalanina*		6,1	3,8	4,9	3,5	4,6
somatória		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

* aminoácidos essenciais

Tabela 29 : Teor de aminoácidos livres e totais em amostras residuais após hidrólise pela mistura.

aminoácidos		amostra 1	amostra 2	média	desvio padrão	FAO/WHO
		(g/100ml)	(g/100ml)	(g/100ml)		(g/100g)
lisina	*	0,0075	0,0076	0,0076	0,000050	1,5730
histidina		0,0029	0,0030	0,0030	0,000034	0,6030
arginina		0,0058	0,0060	0,0059	0,000091	1,1118
triptofano	*	0,0000	0,0000	0,0000	0,000000	0,0000
ac. aspártico		0,0073	0,0079	0,0076	0,000281	1,5900
treonina	*	0,0037	0,0038	0,0038	0,000049	0,8120
serina		0,0032	0,0033	0,0032	0,000058	0,7130
ac. glutâmico		0,0128	0,0125	0,0126	0,000177	2,7030
prolina		0,0029	0,0028	0,0029	0,000078	0,6680
glicina		0,0038	0,0038	0,0038	0,000003	0,8600
alanina		0,0048	0,0048	0,0048	0,000012	1,0330
1/2 cistina		0,0006	0,0009	0,0007	0,000149	0,2260
valina	*	0,0036	0,0036	0,0036	0,000001	0,8860
metionina	*	0,0022	0,0024	0,0023	0,000101	0,4780
isoleucina	*	0,0034	0,0033	0,0033	0,000009	0,8520
leucina	*	0,0066	0,0067	0,0067	0,000053	1,4350
tirosina		0,0032	0,0033	0,0032	0,000047	0,6370
fenilalanina*		0,0032	0,0035	0,0034	0,000148	0,7780
somatória		0,0778	0,0792	0,0785	0,000705	16,9588

* aminoácidos essenciais

7 - Análises por eletroforese.

As proteínas da carne apresentam seus pesos moleculares compreendidos em valores desde 510.000 para a miosina até 56.000 para a tropomiosina (34). Da hidrólise enzimática da proteína espera-se obter fragmentos de baixos pesos moleculares. O processo dinâmico estabelece uma quebra da proteína em componentes solúveis que sofrem sucessivos ataques enzimáticos e consequentemente diminuem de tamanho.

Não foi possível a detecção de peptídeos de pesos moleculares menores que 10.000 em géis de poliacrilamida, em concentrações superiores a 15 % ou mesmo preparando-se gradientes de gel. Possivelmente, os fragmentos não são retidos pelo gel. Segundo LAEMMLI (59) peptídeos de pesos moleculares menores de 10.000 migram com o corante, conforme evidenciado na Figura 31.

A eletroforese desenvolvida neste estudo dá uma visualização para componentes cujo peso molecular está compreendido entre 60.000 e 10.000, e segundo WASSERMAM (101) a técnica PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida) não é indicada para a resolução de peptídeos com peso molecular inferior a 10.000, recomendando-se para esses casos, outros processos.

Os resultados percentuais das experiências feitas para o tempo 0, ou seja, da carne sem tratamento, mostram uma variação muito pequena entre eles.

O suco de carne tem pequena quantidade de componentes de peso molecular compreendidos entre os 30.000 e 40.000, sendo

nulos para de 15.000 a 20.000. Pelos resultados da análise dos componentes da carne, encontram-se presentes polipeptídeos em cinco das seis faixas de pesos moleculares propostos.

A Tabela 30 mostra os resultados referentes a digestão da carne pela papaína. Vê-se logo nos primeiros 30 minutos um deslocamento das bandas para as extremidades, isso é, para o lado dos pesos moleculares de 50.000 a 60.000 e, dos 20.000 a 15.000. Essa tendência vai se acentuando cada vez mais, tanto é que após os 60 minutos não se detectou componentes nas faixas de 20.000 a 30.000 e na de 30.000 a 40.000. Esses polipeptídeos são hidrolisados muito rapidamente e por essa razão nem chegam a ser detectados.

Para as faixas de pesos moleculares 15.000 a 20.000 bem como as de 50.000 a 60.000 e 40.000 a 50.000, nota-se a manutenção das porcentagens durante todo o tempo. Significando serem as velocidades de decomposição neste trecho iguais às daquelas das proteínas de maior peso molecular.

No caso da tripsina (Tabela 31, Figura 31), o fenômeno evidenciado é diverso do anteriormente analisado, pois há um enriquecimento, ou aumento no teor de polipeptídeos na faixa de peso molecular de 20.000 a 30.000. A impressão é que a velocidade de desdobramento até peso molecular 20.000 a 30.000 é menor. Ocorre dessa forma acúmulo e, a partir desses para as faixas dos menores há uma aceleração. Os valores caem a zero, sendo os peptídeos rapidamente degradados e assim não se consegue detectá-los.

Para a protease (Tabela 32) tem-se também um desdobramento característico da carne onde se nota um aumento de teor de polipeptídeos na faixa de peso molecular de 15.000 a 20.000, logo nos primeiros 30 minutos de tratamento. A seguir, o valor passa a ser absoluto (100%) nos tempos de 60, 90 e 120 minutos dando a impressão de que a enzima age mal sobre esses peptídeos.

No entanto, após os 120 minutos, aumenta o teor de peptídeos na faixa dos 20.000 a 30.000 fazendo assim baixar o percentual daquela correspondente de 15.000 a 20.000.

Na maioria dos casos a molécula protéica é mais susceptível a subsequente proteólise após hidrólise inicial de uma ou mais ligações peptídicas. Entretanto, existem algumas exceções a esse comportamento. Após uma ou mais ligações terem sido quebradas a molécula pode tornar-se mais resistente ao ataque enzimático, esse fenômeno é conhecido por proteólise limitada.

WHITAKER (102) propõe a ocorrência da hidrólise da ligação peptídica numa região susceptível da molécula as outras ligações similares remanescentes tornam-se resistentes à proteólise. Ainda propõe existirem diversas ligações susceptíveis, mas após hidrólise de uma destas, a molécula protéica mudaria sua conformação tornando suas ligações peptídicas protegidas ao ataque enzimático.

Quando se estuda a Tabela 33, referente aos dados obtidos com a mistura de enzimas, observa-se que no transcorrer das experiências a cada tempo se evidencia a característica de uma das enzimas participantes do "pool". Assim, tem-se no início as características da papaína e da tripsina. Aos 60 minutos parece haver um reforço da tripsina e ao final aparece melhor o efeito da protease principalmente nos 150 e 180 minutos.

Tabela 30 : Teor percentual de peptídeos em função do tempo de hidrólise, resultante da digestão da proteína de carne bovina pela papaína. Peso molecular entre 60.000 e 10.000.

PM	tempo de hidrólise (min)						
	0	30	60	90	120	150	180
60-50.000	7,06	3,63	4,13	5,37	4,25	1,48	5,01
50-40.000	8,70	0,80	3,69	2,94	3,07	5,83	1,34
40-30.000	1,44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30-20.000	10,11	1,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20-15.000	6,62	5,20	2,51	5,83	4,07	2,10	2,38
15-10.000	0,00	0,00	0,44	0,25	0,30	0,00	0,21

Tabela 31 : Teor percentual de peptídeos em função do tempo de hidrólise, resultante da digestão da proteína de carne bovina pela tripsina. Peso molecular entre 60.000 e 10.000.

[illegible]

Tabela 32 : Teor percentual de peptideos em função do tempo de hidrólise, resultante da digestão da proteína de carne bovina pela protease microbiana. Peso molecular entre 60.000 e 10.000.

[illegible]

Tabela 33 : Teor percentual de peptídeos em função do tempo de hidrólise, resultante da digestão da proteína de carne bovina pela mistura de enzimas. Peso molecular entre 60.000 e 10.000.

PM	tempo de hidrólise (min)						
	0	30	60	90	120	150	180
60-50.000	6,56	3,36	1,52	1,13	0,60	0,90	0,69
50-40.000	8,08	2,45	0,19	0,98	1,31	1,03	0,00
40-30.000	1,34	0,00	0,00	1,72	0,00	1,34	7,24
30-20.000	9,39	0,30	2,21	1,77	1,37	0,64	0,00
20-15.000	6,16	0,30	5,61	5,45	4,93	4,18	17,06
15-10.000	0,00	0,00	0,22	0,00	0,00	0,00	0,00

Figura 31 : Eletroforese da proteína de carne bovina hidrolisada pela tripsina em função do tempo, separadas em 15 % SDS-gel de poliacrílamida.

8 - Composição centesimal

A Tabela 34 apresenta os resultados da análise da composição centesimal da matéria-prima e de seu hidrolisado protéico.

Os resultados mostram ser o hidrolisado produto de alto teor protéico. A carne apresentou resultados semelhantes aos da literatura (32).

Tabela 34 : Composição química de hidrolisado protéico de carne.

	carne	hidrolisado de carne
umidade (%)	74,29	3,67
proteína (%)	18,69	63,11
lipídes (%)	3,02	11,57
cinzas (%)	1,09	4,65

9 - Controle microbiológico

A Tabela 35 mostra os resultados da análise microbiológica de hidrolisado protéico de carne. O produto apresenta qualidade microbiológica boa, encontrando-se dentro das normas estabelecidas pelo CODIGO SANITARIO (23) para produtos de carne.

Tabela 35 : Contagem microbiológica de hidrolisado de carne.

determinação		hidrolisado de carne
contagem padrão	(UFC/g)	< 30
bolores e leveduras	(UFC/g)	< 30
coliformes totais	(NMP/g)	< 3,0
coliformes fecais	(NMP/g)	< 3,0
<u>Escherichia coli</u>	(NMP/g)	< 100
<u>Staphylococcus aureus</u>	(UFC/g)	< 3,0
<u>Salmonella</u>		ausente em 25 g produto

VII - CONCLUSOES

- A eficiência do ataque das enzimas sobre as proteínas da carne bovina deu-se na seguinte ordem: primeiro a mistura de enzimas, seguida da papaína e da tripsina e finalmente da protease microbiana segundo os parâmetros solubilidade e grau de hidrólise.
- Passados 120 minutos de hidrólise nas condições de trabalho os valores de graus Brix, sólidos solúveis e grau de hidrólise mantiveram-se inalterados.
- Na faixa de velocidades angulares ensaiadas o hidrolisado protéico comportou-se como um fluido não-Newtoniano, pseudoplástico.
- A viscosidade do hidrolisado é de 1,7 a 36,0 poise a 30 °C e 2,4 a 52,7 poise a 60 °C.
- Os valores máximos para a viscosidade são alcançados aos 90 minutos de hidrólise.
- O aumento da concentração de proteína solúvel, aumenta a capacidade de emulsificação do óleo de soja em água, acarretando uma diminuição do diâmetro dos glóbulos de gordura.
- Durante a hidrólise ocorre um aumento na concentração de aminoácidos livres.

- O tratamento com a mistura de enzimas promove enriquecimento do solúvel em aminoácidos essenciais. Com a papaína ocorre o inverso.
- O teor de aminoácidos livres existentes na carne é baixo. Em apenas 30 minutos de tratamento enzimático na média a concentração eleva-se em 5,7 vezes.
- O aminoácido liberado em maior teor em todos tratamentos foi a arginina. O triptofano foi detectado entre os livres e os teores de fenilalanina sempre estiveram abaixo do valor proposto pela FAO.
- O tratamento hidrolítico mais eficiente foi conseguido com a mistura de enzimas segundo a análise do perfil de aminoácidos.
- As análises eletroforéticas revelaram a progressão da hidrólise mostrando as diferentes manchas de pesos moleculares cada vez menores.
- O hidrolisado é um produto de alto teor de oligopeptídeos solúveis e de aminoácidos livres, isento de contaminação microbiana.
- Durante o transcorrer do processo hidrolítico há uma variação constante nas características do solúvel e na sua composição aminoacídica.

VIII - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 - ADLER-NISSEN, J. Enzymatic modification of proteins for increased solubility. Abstr. Pap. Am. Chem.Society, Washington, 1975 . 170 p.
- 2 - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Compendium of methods for the microbial examination of foods. Washington, 1976.
- 3 - ARMANET, J.M.; GIDDEY, C.; SACHETTO, J.P. Hydrolysys of proteins of animal or plant origin. European Patent Application EP 0 169 166 A1. 1986. Apud:Food Sci.Technol.Abstr., Sheffield, 18:10V101, 1986.
- 4 - ASAKURA, Y. Hidrólise de proteínas da carne bovina pela ação da papaína, bromelina e ficina. São Paulo, 1982. 198 p. [Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP].
- 5 - ASSOSSIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis, 13 ed., Washington, 1980. p.132-5.
- 6 - AVIS, K.E. Parenteral preparations. In: REMINGTON'S pharmaceutical sciences. 16 ed. Easton, Mack, 1980. p.1463-87.
- 7 - BAILEY, A.J. Recent advances in the chemistry of meat. London, Royal Society of Chemistry, 1983. 245 p.

- 8 - BARUFFALDI, R.; COLOMBO, A.J.; FONTINELE, E.M.C.; RAMOS, O.H.R. Influência da ação de enzimas vegetais proteolíticas sobre a carne. Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo, São Paulo, 13(1):63-74, 1975.
- 9 - BARUFFALDI, R.; COLOMBO, A.J.; SCHUCH, R.; GIOIELLI, L.A. Ação de enzimas vegetais proteolíticas sobre a carne. An. Farm. Quim. S. Paulo, São Paulo, 21(2):81-84, 1981.
- 10 - BARUFFALDI, R.; COLOMBO, A.J.; VESSONI PENNA, T.C. Influência da temperatura em processo sobre o teor de sólidos solúveis e a contaminação de digesto de carne. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACIA E BIOQUIMICA, 12, Rio de Janeiro, 1977. Resumos, Rio de Janeiro, 1977.
- 11 - BECHER, P. Emulsiones:teoria y practica. Madrid, Blume, 1972. 398 p.
- 12 - BEHNKE, U.; ACKERMANN, E.; KROLL, J.; WEIBELZAHN, H.; KALINNA, B. Preparation of seasonings with a meat-like flavor. German Democratic Republic Patent DD 217 980, Berlin, 1985. Apud:Food Sci.Technol.Abstr., Sheffield, 18:1T5, 1986.
- 13 - BEHNKE, V.; KISS, E.; NADUARI, V.; RUTLOFF, H. Enzymatic modification of egg-white and some of its functional properties. Nahrung, Berlin, 30(3/4):319-26, 1986.
- 14 - BEHLTZ, H.D. & FRIEDEN, E. Food chemistry, Springer-Verlag, New York, 1987. p.7-127.

- 15 - BENNET, T. & FRIEDEN, E. Tópicos modernos de bioquímica: estrutura e função das moléculas biológicas.
São Paulo, Mcmillan , 1971. p.13-39.
- 16 - BERK, Z. Protein systems in foods. In: BRAVERMAN'S introduction to the biochemistry of foods. Amsterdam, Elsevier, 1976. p. 61-77.
- 17 - BOTH, A. Enteral nutrition - an overview. New York, Hill, 1981, v.2, p.76-103.
- 18 - BRENER, N.; NIEDERWISER, A.; PATAKI, G. Amino acids and derivatives. In: STAHL, E., ed. Thin-layer chromatography: a laboratory handbook. 2.ed. New York, 1969. p.730-81.
- 19 - CAILLAU, P. & MORGAN, P. Preparation and preservation of a protein hydrolysate used as an agriculture feed.
Apud: Food Sci. Technol. Abstr., Sheffield, 177655, 1985.
- 20 - CANHOS, D.A.L. & DIAS, E.L. Tecnologia de carne bovina e produtos derivados. São Paulo, Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia. 1982. 440 p.
- 21 - CHEFTEL, J.C. & CHEFTEL, H. Introduccion a la bioquímica de los alimentos. Zaragoza, Acribia, 1976. p. 43-63.

- 22 - CHOI, Y.R. & RHEE, K.C. Development of modified and milk-complexed oilseed protein ingredients. Annual progress report. Food Protein Development Center, Texas, p.301-16, 1984. Apud: Food Sci. Technol. Abstr., Sheffield, 18:11649, 1984.
- 23 - CODIGO sanitário. São Paulo, IMESP, 1978. p.163. [Decreto n.12.486, 20/10/78. Nota técnica n.4].
- 24 - DJORDJEVIC, V. & SKENDEROVIC, B. Effect of plant proteases on some properties of salt-cured pork. Tech. Mess., Munich, 7(2):37-43, 1966.
- 25 - DOSE, K. Bioquímica. São Paulo, E.P.V. Springer - EDUSP, 1980. p. 30-77.
- 26 - DUSCHANEK, V.; PICHLER, I.; SCHUBERT, G.; PECSI, I. Method for preparing protein hydrolysate appropriate for human consumption from waste and/or slaughter by-products, particularly heads, hocks, and skin of pigs. PCT International Patent Application, WO 86/04487 A1, 1986. Apud: Food Sci. Technol. Abstr., Sheffield, 19:2V211, 1987.
- 27 - EL-GHARBAWI, M. & WHITAKER, J.R. Factor affecting enzymatic solubilization of beef proteins. J. Food Sci., Chicago, 28(2):168-72, 1963.

- 28 - ERNSTER, J.H. Hydrolysed protein composition and process used in preparation thereof. United States Patent US 4 545 933, 1985. Apud:Food Sci.Technol.Abstr., Sheffield, 17:566, 1985.
- 29 - ERNSTER, J.H. Milk protein hydrolyzate and process of preparation. United States Patent US 4 600 588, 1986. Apud:Food Sci.Technol.Abstr., Sheffield, 18:2V212, 1986.
- 30 - FOOD AND NUTRITION BOARD, NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Recommended dietary allowances. 8 ed. Washington DC, 1974.
- 31 - FOOD POLICY AND FOOD SCIENCE SERVICE. Amino-acid content of food and biological data on proteins. Biological data on proteins, Nutrition Division, In: FAO. Nutrition Studies, Roma, 1979. p.116-7.
- 32 - FRANCO, G. Tabela de composição química dos alimentos. 7.ed., São Paulo , Atheneu, 1986. 145 p.
- 33 - FREEMAN, L.D. & SAWHILL, J.W. Protein liquefaction. US Appl., 256:417, 1981. Apud:Chem. Abstr., Columbus, 101:228849y, 1984.
- 34 -FRIBERG, S. Food emulsions. New York, Marcel Dekker, 1976. 480 p.

- 35 - GOSSET, P.W.; RIZVI, S.S.; BAKER, R.C. Quantitative analysis of gelation in egg protein systems. Food Technol., New York, 38(5):72-4, 96, 1984.
- 36 - GRUNDEN, L.P. The effect of proteolytic enzymes on functional and physical properties of egg albumen. Diss. Abstr. Int., Ann Arbor, 37(1):145-146, 1977.
- 37 - HAMPTON, M.G. Process for and product of protein hydrolysis. British Patent, 1.494.856., London, 1977.
Apud:Food Sci. Technol. Abstr., Sheffield, :86488, 1984.
- 38 - HARTLEY, B.S. Proteolytic enzymes. Ann. Rev. Biochem., Palo Alto, 29:45-72, 1960.
- 39 - HAYS, P.P.; HARRISON, D.L.; VAIL, G.E. Effects of meat tenderizer on less tender cuts of beef cooked by four methods. Food Technol., New York, 7:217-20, 1953.
- 40 - HILL, R.L. Hydrolysis of proteins. Adv. Protein Chem. New York, 2:37-107, 1965.
- 41 - HINRICHS, J.R. & WHITAKER, J.R. Enzymatic degradation of collagen. J. Food Sci., Chicago, 27:250-4, 1962.
- 42 - HUANG, F. & RHA, C.K. Rheological properties of single-cell protein concentrate:dope formation and its flow behavior. J. Food Sci., Chicago, 36:1131-34, 1971.

- 43 - HUFFMAN, D.L.; PALMER, A.Z.; CARPENTER, J.W.; HENTGES JR, J.F. Effect of ante-mortem injection of sodium chloride, papain and derivatives on the tenderness of beefs. J. Anim. Sci., Champaign, 26(2):285-9, 1967.
- 44 - HUFFMAN, D.L.; PALMER, A.Z.; CARPENTER, J.W.; SHIRLEY, R.L. Effect of ante-mortem injection of papain on tenderness of chickens. Poultry Sci., Champaign, 40:1627-30, 1961.
- 45 - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz : métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2. ed. São Paulo, 1976. v.1, p.19-20; 24; 36-7.
- 46 - ISHIDA, K. & YAMAMOTO, A. Flavoring substances. III Enzymic hydrolysis of chicken meat and flavor of hydrolysates. J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol., Tokyo, 24(4):171-8, 1977.
- 47 - KANG, C.K. & RICE, E.E. Degradation of various meat fractions by tenderizing enzymes. J. Food Sci., Chicago, 35:563-5, 1970.
- 48 - KANG, C.K. & WARNER, W.D. Tenderization of meat with papaya latex proteases. J. Food Sci., Chicago, 39:812-8, 1974.
- 49 - KARLSON, P. Introduction to modern biochemistry. Academic Press, New York, 1975. p.21-73.

- 50 - KARMAK, E. Processed meat technology. Washington, Library of Congress, 1976. 449 p.
- 51 - KATO, S.; SUZUKI, I.; ISHII, T.; YANO, N. Effect of proteolytic enzyme on the antibacterial property of egg albumen. Agric. Biol. Chem., Tokyo, 41(5):727-31, 1977.
- 52 - KHABATAKE, N. & DOI, E. Heat-induced transparent gel prepared from pepsin-treated ovalbumin and egg white. Agric. Biol. Chem., Tokyo, 49(8):2457-2458, 1985.
- 53 - KILARA, A. Enzyme-modified protein food ingredients. Process Biochem., London, 20(5):149-57, 1985.
- 54 - KITAYAMA, H.; TAGAWA, M.; YOTUYA, M.; YAMADA, K. A histological study on the tenderization effect in meat cooking. Effect of papain. Keikoku Gakuen Kogyo, 1:27-35, 1975. Apud:Chem.Abstr., Columbus, 85:450823, 1976.
- 55 - KNIGHT, M.K. Interactions of proteins in meat products. I. Survey of the literature Scientific and Technical Surveys, Leatherhead Food RA, United Kingdom, 1986, 19 p. Apud:Food Sci.Technol.Abstr., Sheffield, 19:8517, 1987.
- 56 - KOBAYASHI, H.; KUSAKABE, I.; MURAKAMI, K. Substrate specificity of the milk clotting enzyme from Irpex lacteus on α S1-casein. Agric. Biol. Chem., Tokyo, 49(6):1611-19, 1985.

- 57 - KOBAYASHI, H.; KUSAKABE, I.; OKOYAMA, S.; MURAKAMI, K.
Substrate specificity of the milk clotting enzyme of
Irpex lacteus on K-and beta-casein. Agric. Biol. Chem.,
Tokyo, 49(6):1621-31, 1985.
- 58 - KRAUSE, M.V. & MAHAN, L.K. Alimentos, nutrição e
dietoterapia. São Paulo, Roca, 1985. p.77-100.
- 59 - LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the
assembly of the head of bacteriophage T4. Nature,
London, 227:680-5, 1970.
- 60 - LAWRIE, R.A. Meat science. 4. ed. Washington, Pergamon,
1985. 267 p.
- 61 - LAWRIE, R.A. Developments in meat science - 2. London
Applied Science Publishers, 1981. 299 p.
- 62 - LEHNINGER, A.L. Bioquímica. São Paulo, Blucher, 1976.
v.1, 272 p.
- 63 - LIESKE, B.; KONRAD, G.; SCHULZE, W. Manufacture of
protein hydrolysates with modified flavor. German
Democratic Republic Patent DD 217 981, Berlin. 1985.
Apud:Food Sci.Technol.Abstr., Sheffield, 18:1T6, 1986.
- 64 - LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.V.; FARR, R.V.; RANDALL, R.V.
Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.
Biol. Chem., Baltimore, 193:265-71, 1951.

- 65 - MANLEY, C.H.; McCANN, J.S.; SWAINE, R.L.Jr. Quality of foods and beverages:chemistry and technology. 1981. v.1, p.61-82.
- 66 - MELACHOURIS, N.; LEE, C.R.; LIN, C.I. Process for the preparation of protein hydrolysates (for food applications). United States Patent US 4 600 588, 1986. Apud:Food Sci.Technol.Abstr., Sheffield, 19:2V217, 1987.
- 67 - MELTZER, D.E. Biochemistry: the chemical reaction of living cells. New York, Academic Press. 1977. p.47-78.
- 68 - MENENDEZ, A.M. Unidade de nutricion enteral y parenteral. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACIA E BIOQUIMICA,4.; CONGRESSO PAULISTA DE FARMACEUTICOS,5. São Paulo, 1985.
- 69 - MENENDEZ, A.M.; BERTRAND, N.; BIANCO, G. Participacion do farmacêutico clinico en la alimentacion parenteral, enteral y oral. In: REUNION LATINOAMERICANA DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, Chile, 1983.
- 70 - MIETCSH, F.; BARATH, A.; HALASZ, A. Investigation of the dependence of certain funcional properties of proteins on the degree of hydrolysis. Nahrung, Berlin, 30(3-4):419-21, 1986.
- 71 - MOORE, S. ; SPACKMAN, D.H. ; STEIN, W.H. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. Anal. Chem., Washington, 30(7):1185-90, 1958.

- 72 - McINTOSH, E.N. & CARLIN, A.G. The effect of papain preparations on beef skeletal muscle proteins. J. Food Sci., Chicago, 28:283-5, 1963.
- 73 - NEY, K.H. Flavor enhancing effect of L-glutamate and similar compounds. Unters. Forsch., Hamburg, 146:141-3, 1971.
- 74 - NOSHO, Y.; OTAGIRI, K.; SHINODA, I.; OKAI, H. Studies on a model of bitter peptides including arginine, proline and phenylalanine. II. Bitterness behavior of a tetrapeptide (arg-pro-phe-phe) and its derivatives. Agric. Biol. Sci., Tokyo, 49(6):1829-37, 1985.
- 75 - NUNES, M.L. & GEROMEL, E.J. Hidrolisado protéico de tilápia: determinação de algumas condições de processamento. Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas, 2(2):164-79, 1982.
- 76 - OTAKA, F. & HONGO, F. Digestion of beef by various proteolytic enzymes. J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol., Tokyo, 12(3):101-5, 1965.
- 77 - PARK, Y. & DRAETTA, I.S. Aplicação de enzimas proteolíticas no amaciamento da carne de boi. Rev. Bras. Tecnol., São Paulo, 2(3):125-9, 1971.
- 78 - PEIRO, C.P. & TORRES, N.V.J. Nutricion enteral en el adulto : concepto e desarrollo. In: TORRES, N.V.J. Mezclas intravenosas y nutricion artificial., 2.ed, Ramirez, Valencia, 1983. p.491-518.

- 79 - PENNY, I.F.; VOYLE, C.A.; DRANSFIELD, E. Tenderization effect of a muscle proteinase on beef. J. Sci. Food Agric., London, 25(6):703-8, 1974.
- 80 - PETERSEN, B.R. The impact of enzymic hydrolysis process on recovery and use of pro-teins. In: BIRCH, G.G.; BLAKEBROUGH, N.; PARKER, K.J. Enzymes and food processing. London, Applied Science Publishers, 1981. p.149-75.
- 81 - QUAGLIA, G.B. & ORBAN, E. Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from sardine (*Sardina pilchardus*). J. Sci. Food Agric., London, 38(3):271-6. 1987.
- 82 - RAGHUNATH, M. & RAOS, B.S. Release of peptides and amino acids from dietary proteins during sequential enzymic digestion in vitro with pepsin, pancreatin+trypsin and erepsin. Food Chem., Essex, 15(4):285-306. 1984.
- 83 - RAO, M.A. Rheology of liquid foods - a review. J. Texture Stud., Westport, 8:135-68, 1977.
- 84 - RATTRIE, W.W. & REGENSTEIN, J.M. Action of crude papain on actin and myosin heavy chains isolated from chicken breast muscle. J. Food Sci., Chicago, 42(5):1159-63, 1977.
- 85 - REGENSTEIN, J.M.; GRUNDEN, L.P.; BAKER, R.C. Proteolytic enzymes and the functionality of chicken egg albumen. J. Food Sci., Chicago, 43(1):279-80, 1978.

- 86 - RHA, C. Theory, determination and control of physical properties of food materials. Boston, Reidel, 1973. p.7-25.
- 87 - ROBBINS, F.M.; WALKER, J.E.; COHEN, S.H.; CHATTERJEE, S. Action of proteolytic enzymes on bovine myofibrils. J. Food Sci., Chicago, 44:1672-7, 1979.
- 88 - RODDA, D.D. The relationship among refractive index, percentage solids and percentage protein egg albumen. Poult. Sci., Champaign, 55(3):1117-8, 1976.
- 89 - SALMONA, M.; MUSSINI, E.; POCCHIARI, F.; BEGGOLIN, G. Determination of dipeptides in protein hydrolysates for total parenteral nutrition. J. Chromatogr., Amsterdam, 246(2):334-9, 1982.
- 90 - SASE, H.; WATANABE, M.; ARAI, S.; OGAWA, Y. Functional and sensory properties of meat emulsions produced by using enzymatically modified gelatin. J. Food Sci., Chicago, 52(4):893-5, 1987.
- 91 - SHANK, J.L. Preparation of hydrolyzed collagen-containing products from non-gelled liquid hydrolysed collagen concentrate and gelled products prepared therefrom. United States Patent US 4.528.204, 1985. Apud:Food Sci.Technol.Abstr., Sheffield, 18:9V110, 1985.

- 92 - SHIMIZU, M.; LEE, S.W.; KAMINOGAWA, S.; YAMAUCHI, K.
Functional properties of a peptide of 23 residues purified from the peptide hydrolysate of alfa-s1-casein: changes in the emulsifying activity during purification of peptide. J. Food Sci., Chicago, 51(5):1248-52, 1986.
- 93 - SHIMOKOMAKI, M. Textura da carne. Bol. Inst. Tecnol. Aliment., Campinas, 33:43-56, 1973.
- 94 - STABILE, M.N.O. & BARUFFALDI, R. Grau de hidrólise e solubilidade de hidrolisados protéicos de clara de ovo. Boletim do CEPPA, Curitiba, 6:79-86, 1988.
- 95 - STRYER, L. Bioquímica. Barcelona, Reverte, 1979. p.11-41.
- 96 - SWAN, J.E. Technical and economic feasibility of producing plasma and hydrolysed red blood cells from edible grade blood. Publications, Meat Industry Research, Mirinz, 1982. 42 p.
- 97 - TAKEDA, M. & OKEDA, T. Utilização de carne liofilizada em dietoterapia. Rev. Med. IAMSPE, São Paulo, 1(1):23, 1970.
- 98 - TRIGO, M. & SAKAKI, M. Estudo da complementação alimentar em prematuros (recém-nascidos de baixo peso): Avaliação de 56 casos com controle domiciliar. Rev. Med. IAMSPE, São Paulo, 6(2):9-14, 1975.

- 99 - VALLEJO-CORDOBA, B.; NAKAI, S.; POWRIE, W.D.; BEVERIDGE, T. Protein hydrolysates for reducing water activity in meat proteins. J. Food Sci., Chicago, 51(5):1156-61, 1986.
- 100 - VILLELA, G.G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. Bioquímica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1978, p.58-104.
- 101 - WASSERMAN, B.P. Detection of proteolysis by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis : a demonstration of protein hydrolysis and electrophoresis fundamentals. J. Food Biochem. , Westport, 10:83-91, 1986.
- 102 - WHITAKER, J.R. Principles of enzymology for the food sciences. New York, Dekker, 1972, v.2, p.511-42.
- 103 - WIELAND, H. Enzymes in food processing and products. New Jersey, Noyes, 1972, p.130-63.
- 104 - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Energy and protein requirements. Geneve, 1973. p. [Technical Report n. 522].
- 105 - YAMAMOTO, A. Proteolytic enzymes. In: REED, G., ed. Enzyme in food processing, 2. ed., New York, 1975, Academic Press. p.123-79.

106 - YURIKOV, K.H.; ZAKHARIEV, I.; PESHEUSKA, M.; PETROVH, S.

Effect of the heat treatment on the enzymic hydrolysis of meat proteins. Proceedings of the european meeting of the meat research workers. Apud:Food Sci.Technol.Abstr., Sheffield, 18:85209, 1986.

As referências bibliográficas estão de acordo com as normas preconizadas pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE INDEX (CASSI), Columbus, 1984.