UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em
Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO BIOTECNOLÓGICO
DE HIDRÓLISE DE CARNE BOVINA

MARICÊ NOGUEIRA DE OLIVEIRA STABÍLE

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. RENATO BARUFFALDI

São Paulo
1991

Todas as coisas são possíveis àquele
que crê.

São Marcos, 11:23.

Referência em: 09/09/71

AGRADECIMENTOS

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

A Profa. Dra Maria Elena dos Santos Taqueda do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP pela orientação relativa a otimização do processo de hidrólise enzimática da carne.

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

A Profa. Maria Elisabete Pinto e Silva e as nutricionistas Elaine Donizetto Alvares e Rosário Alonso Nieyo do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Usp que semearam a idéia do uso do suco de abacaxi como fonte natural de enzima no preparo da carne pré-digerida.

As meninas estagiárias e amigas Elke Stedefeldt e Márcia Cristina Basílio pelo auxílio no laboratório e em todos os momentos em que foram preciso fazer e repetir os experimentos.

Ao CNPq e ao COSEAS pelas bolsas de iniciação científica concedidas as estagiárias Márcia e Elke respectivamente.

Ao Prof. Dr. Mauro Faber Freitas Leitão do Instituto de Tecnologia de Alimentos pela cepa de Bacillus stearothermophilus.

Ao amigo Oswaldo Marmo por colocar o laboratório a minha disposição para o desenvolvimento dos estudos dos parâmetros de resistência térmica de esporos de Bacillus stearothermophilus.

A Suely Cabrini, amiga e cuidadosa microbiologista por ter atravessado comigo quatro meses de ensaios semanais além dos feriados de Natal e Ano Novo sobre os experimentos de resistência térmica de esporos de Bacillus stearothermophilus.

Ao pessoal todo do laboratório da Nestlé em especial ao da microbiologia pela paciência, amizade e consideração.

Ao Prof. Dr Reynaldo Nacco pela consideração e apoio sempre presentes, apesar dos esquecimentos.

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

Ao Domingos Zucarelli pela possibilidade do uso da impressora a laser.

A Maria Aparecida Stabile pelo desenho da Figura final a cores.

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

Aos funcionários Juarez, Angela, Maria do Rosário, Ivani, Lúcia e Terezinha do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela presença nos momentos necessários.

INDICE

página

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	XIII
RESUMO	XIX
ABSTRACT	XXI
I - Introdução	1
II - Revisão Bibliográfica	2
2.1 - As proteínas da carne	2
2.1.1 - Proteínas intracelulares	2
2.1.1.1 - Proteínas sarcoplasmáticas	2
2.1.1.2 - Proteínas miofibrilares	3
2.1.1.3 - Filamentos e proteínas intermediárias	9
2.1.2 - Proteínas extracelulares	10
2.1.2.1 - Colágeno	10
2.1.2.2 - Reticulina	12
2.1.2.3 - Elastina	13

2.2 -	Efeitos do tratamento térmico sobre as proteínas	II. 14
2.2.1 -	Desnaturação protéica	14
2.2.2 -	Interações proteína-proteína	16
2.2.3 -	Desenvolvimento de textura	17
2.2.4 -	Propriedades de retenção de água	19
2.3 -	Efeitos do tratamento enzimático sobre as proteínas	20
2.4 -	Resistência térmica de <u>Bacillus stearothermophilus</u>	25
III -	Objetivos	28
IV -	Material, métodos e parte experimental	29
4.1 -	Material	29
4.1.1 -	Enzimas	29
4.1.2 -	Carne	29
4.1.3 -	Equipamentos de laboratório	29
4.1.4 -	Reagentes analíticos e soluções reagentes	31
4.1.4.1 -	Reagentes analíticos	31
4.1.4.2 -	Soluções reagentes	32
4.1.5 -	Meios e diluentes	33
4.1.6 -	Cepas	34

	III.
4.2 - Métodos	35
4.2.1 - Determinação da atividade enzimática	35
4.2.2 - Determinação do número de graus Brix	37
4.2.3 - Determinação do valor de pH	37
4.2.4 - Determinação da concentração de sólidos solúveis	37
4.2.5 - Determinação da resistência térmica de esporos de <u>Bacillus stearothermophilus</u>	38
4.2.5.1 - Esporulação	38
4.2.5.2 - Preparação dos capilares	41
4.2.5.3 - Tratamento térmico	42
4.2.5.4 - Cálculo dos parâmetros D e Z	43
4.2.6 - Análise estatística	44
4.2.7 - Determinação das condições ótimas de operação	45
4.3 - Parte experimental	46
4.3.1 - Preparo da enzima	46
4.3.2 - Preparo da carne	46
4.3.3 - Hidrólise	47
4.3.3 - Parâmetros de resistência térmica de <u>Bacillus stearothermophilus</u>	47

4.3.4 -	Condições ótimas de operação	IV. 48
V -	Resultados e discussão	52
5.1 -	Enzima	52
5.2 -	Hidrólise	79
5.3 -	Parâmetros de resistência térmica de <u>Bacillus stearothermophilus</u>	92
5.4 -	Condições ótimas de operação	118
5.4.1 -	Condições ótimas de operação para atividade enzimática	118
5.4.2 -	Condições ótimas de operação para a concentração de sólidos solúveis	130
5.4.3 -	Condições ótimas do processo	142
- VI -	Conclusões	145
VII -	Referências bibliográficas	148

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 : Curva de referência para a dosagem de proteínas pelo método de LOWRY. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 2 : Curva de referência para a interpolação da leitura na escala do refratômetro da concentração de sólidos solúveis. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 3 : Atividades médias sobre a caseína de solução a 1% de bromelina bruta em função do valor de pH e da temperatura.

Figura 4 : Médias e intervalos de confiança de 95 % para atividades sobre a caseína de solução a 1% de bromelina bruta segundo o efeito do valor de pH.

Figura 5 : Médias e intervalos de confiança de 95 % para atividades sobre a caseína de solução a 1% de bromelina bruta segundo o efeito da temperatura.

Figura 6 : Atividades médias sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. pérola em função do valor de pH e da temperatura.

Figura 7 : Médias e intervalos de confiança de 95 % para atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. pérola segundo o efeito do valor de pH.

Figura 8 : Médias e intervalos de confiança de 95 % para atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. pérola segundo o efeito da temperatura.

Figura 9 : Atividades médias sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. havaí em função do valor de pH e da temperatura.

Figura 10 : Médias e intervalos de confiança de 95 % para atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. havaí segundo o efeito do valor de pH.

Figura 11 : Médias e intervalos de confiança de 95 % para atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. havaí segundo o efeito da temperatura.

Figura 12 : Ação de bromelina sobre a carne bovina segundo os efeitos de tipo de enzima (bruta, pérola e havaí) e da temperatura (40, 50 e 60 °C) após tratamento por 30 minutos.

Figura 13 : Efeito da temperatura de hidrólise nas médias da concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina após tratamento com bromelina por 30 minutos.

Figura 14 : Efeito do tipo de enzima (bruta, pérola e havaí) nas médias da concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina após tratamento com bromelina por 30 minutos.

Figura 15 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 5,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 109 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 16 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 6,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 109 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 17 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 5,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 112 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 18 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 6,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 112 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 19 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 5,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 115 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 20 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 6,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 115 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 21 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 5,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 118 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 22 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 6,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 118 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 23 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 5,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 121 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 24 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 6,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 121 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 25 : Curva de destruição térmica de esporos Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 5,6. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 26 : Curva de destruição térmica de esporos Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 6,6. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 27 : Influência da temperatura na velocidade de destruição térmica pela relação de Arrhenius de esporos Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 5,6. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 28: Influência da temperatura na velocidade de destruição térmica pela relação de Arrhenius de esporos Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 6,6. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 29: Representação tridimensional da superfície de resposta do modelo de primeira ordem da relação entre a temperatura, o valor de pH e a atividade enzimática de bromelina de suco de abacaxi.

Figura 30: Contornos da equação de primeira ordem obtida da relação entre a temperatura, o valor de pH e a atividade enzimática de bromelina de suco de abacaxi.

Figura 31: Representação tridimensional da superfície de resposta do modelo de segunda ordem da relação entre a temperatura, o valor de pH e a atividade enzimática de bromelina de suco de abacaxi.

Figura 32: Contornos da equação de segunda ordem obtida da relação entre a temperatura, o valor de pH e a atividade enzimática de bromelina de suco de abacaxi.

Figura 33: Representação tridimensional da superfície de resposta do modelo de primeira ordem da relação entre a temperatura, o valor de pH e a concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina.

Figura 34: Contornos da equação de primeira ordem obtida da relação entre a temperatura, o valor de pH e a concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina.

Figura 35: Representação tridimensional da superfície de resposta do modelo de segunda ordem da relação entre a temperatura, o valor de pH e a concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina.

Figura 36: Contornos da equação de segunda ordem obtida da relação entre a temperatura, o valor de pH e a concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina.

Figura 37: Contornos resultantes do acoplamento dos modelos matemáticos de segundo grau das relações entre a temperatura, o valor de pH com a atividade enzimática da bromelina de suco de abacaxi e a concentração de sólidos solúveis para otimização biotecnológica de hidrolisados de carne bovina.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Atividades (ug/ml.min) sobre a caseína de solução a 1 % de bromelina em função da temperatura e do valor de pH para o projeto fatorial 6 x 5 com três repetições.

Tabela 2 : Médias, erros padrão e intervalos de confiança para as atividades sobre a caseína de solução a 1% de bromelina bruta em função do valor de pH e da temperatura.

Tabela 3 : Efeitos do valor de pH e da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) na análise de variância para atividade (ug/ml.min) sobre a caseína de solução a 1 % de bromelina bruta.

Tabela 4 : Análise de comparações múltiplas pelo Teste de Tukey para as médias das atividades sobre a caseína de solução a 1% de bromelina bruta segundo os efeitos de valor de pH e da temperatura.

Tabela 5 : Atividades (ug/ml min) sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi Ananas comosus L. cv."pérola" em função da temperatura e do valor de pH para o projeto fatorial 6 x 5 com três repetições.

Tabela 6 : Médias, erros padrão e intervalos de confiança para as atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. pérola em função do valor de pH e da temperatura.

Tabela 7 : Efeitos do valor de pH e da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) na análise de variância para atividades ($\mu\text{g/ml.min}$) sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi Ananas comosus L. cv."pérola".

Tabela 8 : Análise de comparações múltiplas pelo Teste de Tukey para as médias das atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi cultivar pérola segundo os efeitos de valor de pH e da temperatura.

Tabela 9: Atividades ($\mu\text{g/ml min}$) sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi Ananas comosus L. cv."havaí" em função da temperatura e do valor de pH para o projeto fatorial 6×5 com três repetições.

Tabela 10 : Médias, erros padrão e intervalos de confiança para as atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. havaí em função do valor de pH e da temperatura.

Tabela 11: Efeitos do valor de pH e da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) na análise de variância para atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi Ananas comosus L. cv."havaí".

Tabela 12 : Análise de comparações múltiplas pelo Teste de Tukey para as médias das atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi cultivar havaí segundo os efeitos de valor de pH e temperatura.

Tabela 13 : Concentração de sólidos solúveis (g/100g) e valor de pH de amostras de carne bovina hidrolisadas com solução a 1 % bromelina bruta em diferentes temperaturas.

Tabela 14 : Concentração de sólidos solúveis (g/100g) e valor de pH de amostras de carne bovina hidrolisadas com bromelina de suco de abacaxi Ananas comosus L. cv."pérola" em diferentes temperaturas.

Tabela 15 : Concentração de sólidos solúveis (g/100g) e valor de pH de amostras de carne bovina hidrolisadas com bromelina de suco de abacaxi Ananas comosus L. cv."havaí" em diferentes temperaturas.

Tabela 16: Concentração de sólidos solúveis (g/100g) de hidrolisados de carne em função da temperatura e do tipo de enzima para o projeto fatorial 3 x 3 com duas repetições.

Tabela 17 : Médias, erros padrão e intervalos de confiança para concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina segundo os efeitos de tipo de enzima (bruta, pérola e havaí) e da temperatura (40, 50 e 60 °C).

Tabela 18 : Análise de variância para concentração de sólidos solúveis (g/100g) de hidrolisados de carne bovina segundo os efeitos de tipo de enzima (bruta, pérola e havaí) e da temperatura (40, 50 e 60 °C).

Tabela 19 : Análise de comparações múltiplas pelo Teste de Tukey para as médias das concentrações de sólidos solúveis (g/100g) segundo os efeitos de tipo de enzima (bruta, pérola, havaí) e da temperatura (40, 50 e 60 °C).

Tabela 20: Dados de resistência térmica de esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 hidrolisado de carne bovina valores de pH 5,6 e 6,6 e, na temperatura de 109 °C empregando-se o método dos tubos capilares.

Tabela 21: Dados de resistência térmica de esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina valores de pH 5,6 e 6,6 e, na temperatura de 112 °C empregando-se o método dos tubos capilares.

Tabela 22: Dados de resistência térmica de esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina valores de pH 5,6 e 6,6 e, na temperatura de 115 °C empregando-se o método dos tubos capilares.

Tabela 23: Dados de resistência térmica de esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina valores de pH 5,6 e 6,6 e, na temperatura de 118 °C empregando-se o método dos tubos capilares,

Tabela 24: Dados de resistência térmica de esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina valores de pH 5,6 e 6,6 e, na temperatura de 121 °C empregando-se o método dos tubos capilares.

Tabela 25: Equações de regressão, coeficientes de correlação (r), coeficientes de determinação (r^2), D (tempo de redução decimal), $\log D$, K (constante de velocidade de destruição térmica) de esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisados de carne bovina a valor de $\text{pH} = 5,6$.

Tabela 26: Equações de regressão, coeficientes de correlação (r), coeficientes de determinação (r^2), D (tempo de redução decimal), $\log D$, K (constante de velocidade de destruição térmica) de esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisados de carne bovina a valor de $\text{pH} = 6,6$.

Tabela 27: Alguns valores publicados dos parâmetros D (tempo de redução decimal), Z (resistência do microrganismo a diferentes temperaturas) e E_a (energia de ativação) para esporos de Bacillus stearothermophilus.

Tabela 28: Resultados do modelo fatorial de primeira ordem para atividade enzimática (A.E.) de bromelina de suco de abacaxi com três pontos centrais.

Tabela 29: Modelos de regressão linear múltipla de primeira ordem para estimar a atividade enzimática (A.E.) de bromelina de suco de abacaxi a partir de dados de temperatura e valor de pH .

Tabela 30: Resultados do modelo fatorial composto de segunda ordem para atividade enzimática (A.E.) de bromelina de suco de abacaxi.

Tabela 31: Modelos de regressão linear múltipla de segunda ordem para estimar a atividade enzimática (A.E.) de bromelina suco de abacaxi a partir de dados de temperatura e de valor de pH.

Tabela 32: Resultados do modelo fatorial de primeira ordem para concentração de sólidos solúveis (C.S.S.) de hidrolisados de carne bovina com três pontos centrais.

Tabela 33: Modelo de regressão linear múltipla de primeira ordem para estimar a concentração de sólidos solúveis (C.S.S.) (g/100g) a partir de dados de temperatura e de valor de pH.

Tabela 34: Resultados do modelo fatorial composto de segunda ordem para concentração de sólidos solúveis (C.S.S.) de hidrolisados de carne bovina.

Tabela 35: Modelo de regressão linear múltipla de segunda ordem para estimar a concentração de sólidos solúveis (C.S.S.) (g/100g) a partir de dados de temperatura e de valor de pH.

Hidrolisados de carne bovina são preparados visando a obtenção de pequenos peptídeos ou aminoácidos livres para incorporação em dietas para pessoas em condições fisiológicas especiais.

O objetivo do presente é a otimização do processo biotecnológico de hidrólise da proteína da carne bovina pela bromelina. A otimização é feita em base de tratamentos estatísticos dos resultados experimentais para se desenvolver os modelos. A finalidade é elaborar um produto conservado para utilização em dietas.

Existe efeito de interação entre o valor de pH e a temperatura nas atividades sobre a caseína da bromelina isolada e naquela presente no suco de abacaxi Ananas comosus L.. A enzima presente no suco "in natura" apresenta atividade sobre a caseína superior a bromelina isolada e purificada.

Os efeitos do tipo de enzima e da temperatura simultaneamente não afetam a solubilidade alcançada pelas proteínas da carne bovina hidrolisadas com bromelina.

Hidrolisados de carne bovina inoculados com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 a valor de pH 4,5 não apresentaram sobreviventes mesmo aos 30 segundos de tratamento térmico. Os valores do tempo de redução decimal (D) de esporos de Bacillus stearothermophilus foram de 0,57 min (pH 5,6) e de 0,96 min (pH 6,6); os valores da resistência do

microrganismo a diferentes temperaturas (Z) foram de 6,3 °C (pH 5,6) e de 5,9 °C (pH 6,6).

O modelo matemático para a atividade enzimática de bromelina de suco de abacaxi é:

$$\hat{y} = 171,63 + 13,13 x_1 + 18,25 x_2 + 18,35 x_1.x_2 - 25,59x_1^2 - 53,45 x_2^2$$

A superfície de resposta é do tipo parabolóide elíptica. O valor de pH interfere mais sobre a atividade que a temperatura e o ponto estacionário de máximo indicado pelo modelo é 66,8 ° e valor de pH 6,4.

O modelo matemático para a concentração de sólidos solúveis de carne é:

$$\hat{y} = 7,13 - 1,02 x_1 + 0,81 x_2 + 0,45 x_1.x_2 - 0,42 x_1^2 - 1,52 x_2^2$$

A superfície de resposta é do tipo parabolóide elíptica. O ponto estacionário de máximo para concentração de sólidos solúveis, indicado pelo modelo é 89,5 ° e valor de pH 7,1.

As condições ótimas indicadas pelo modelo para a atividade enzimática de bromelina de suco de abacaxi atendem a condições satisfatórias de teores de sólidos solúveis.

As condições ótimas do processo biotecnológico de hidrólise da carne bovina indicadas pelo acoplamento dos modelos é : temperatura = 66,8 °C, valor de pH = 6,4, atividade enzimática = 175,94 ug/ml.min e concentração de sólidos solúveis = 7,6 g/100g.

ABSTRACT

The protein hydrolyzates production has the aim of preparation of small peptides or amino acids for its use in dietetic foods or with special purposes.

The objectives of the research consist in establishing the optimization of the hydrolytic process of bovine meat by bromelain (statistics and mathematical models). The purpose of the study is the development of a preserved product to be used in diets.

There is an interaction effect of pH and temperature on enzymic activity over casein by bromelain isolated or from ananas Ananas comosus juice. The bromelain from ananas juice has more activity then the isolated one.

The effects of enzyme and temperature together do not affect the solubility of hydrolysed meat proteins.

Meat hydrolysates, pH 4,5, inoculated with spores of Bacillus Stearothermophilus FS 1518 did not show survivors after 30 sec of treatment. The values of thermal death time (D) were 0,57 min (pH 5,6) and 0,96 min (pH 6,6) and, the Z value 6,3 (pH 5,6) and 5,9 (pH 6,6).

The mathematical model for the enzymic activity of bromelain from ananas juice is:

$$\hat{y} = 171,63 + 13,13 x_1 + 18,25 x_2 + 18,35 x_1.x_2 - 25,59x_1^2 - 53,45 x_2^2$$

The surface response is paraboloid elipcal. The stationary maximum point indicated by the model is 66,8 °C and pH 6,4.

The mathematical model for the soluble solids of meat proteins is:

$$\hat{y} = 7,13 - 1,02 x_1 + 0,81 x_2 + 0,45 x_1.x_2 - 0,42 x_1^2 - 1,52 x_2^2$$

The surface response is paraboloid elipcal. The stationary maximum point indicated by the model is 89,5 °C and pH 7,1.

The optimum conditions indicated by the enzymic activity model satisfies the soluble solids contents of meat proteins.

The optimum conditions of the biotechnological process of hydrolysis of bovine meat are: temperature = 66,8 °C, pH = 6,4, enzymic activity = 175,94 ug/ml.min and soluble solids contents = 7,6 g/100g.

I - Introdução

A hidrólise enzimática das proteínas tem sido objeto de diversos estudos visando a modificação das propriedades funcionais e a produção de agentes flavorizantes , pequenos peptídeos e aminoácidos para uso em alimentos dietéticos (1, 9, 10, 11, 13, 24, 25, 31, 32, 41, 44, 45, 47, 50, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 75, 76, 77, 87, 88, 89, 91, 97, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 106, 110, 111, 113, 128).

Os hidrolisados de proteína foram usados com sucesso até princípio de 1970, quando um grande número de soluções contendo aminoácidos cristalizados foram lançados no mercado.

Recentemente tornou-se necessário o desenvolvimento de tecnologia adequada à obtenção e conservação de carne pré-digerida de maneira rápida e fácil utilizando matéria-prima natural (113).

A digestão "in vitro" com auxílio de enzimas em valor de pH adequado permite a obtenção e posterior incorporação do alimento protéico pré-digerido em dietas para recém-nascidos, prematuros, crianças alérgicas e preparados para pacientes pós-cirúrgicos (9, 10, 111, 113, 121, 125).

O alimento pode ser aplicado ainda aos casos de desnutrição, desidratação, regimes de emagrecimento ou como suplemento alimentar. Preparados hipernutritivos, balanceados e pré-digeridos são de fácil administração e já vem sendo utilizados em alguns ensaios clínicos (121, 125).

II - Revisão Bibliográfica

2.1 - As proteínas da carne

As proteínas do músculo tem sido tradicionalmente classificadas em várias categorias baseadas na distribuição, organização, solubilidade e função no músculo vivo.

2.1.1 - Proteínas intracelulares

As proteínas intracelulares são classificadas em três grupos: sarcoplasmáticas, miofibrilares e filamentosas intermediárias (5, 8).

2.1.1.1 - Proteínas sarcoplasmáticas

São as substâncias do sarcoplasma : algumas albuminas e as também chamadas proteínas miogênicas. A maioria das enzimas da etapa glicolítica pertencem a fração miogênica sendo consideradas como as verdadeiramente solúveis em água (5).

As outras frações das proteínas sarcoplasmáticas são solúveis em soluções de baixa concentração salina. Segundo estudos clássicos dividem-se em mioalbumina, mioglobulina e miogênio A e B com base na precipitação com solução de sulfato de amônio. Recentemente a partição das proteínas sarcoplasmáticas é feita em quatro componentes estruturais pela técnica de gradiente de sacarose envolvendo ultracentrifugação. Incluem as frações nuclear, mitocondrial, microsomal e citoplasmática (5, 8).

São conhecidas cerca de cem proteínas presentes na fração sarcoplasmática (7) constituindo 30 a 35 % do total das do músculo e correspondendo a 5 % em peso. Apesar de sua diversidade apresentam muitas características físico-químicas semelhantes: baixo peso molecular, conformação globular e baixa viscosidade.

2.1.1.2 - Proteínas miofibrilares

As substâncias formadoras das miofibrilas (1 a 2 um de diâmetro) nas proteínas do músculo são definidas como miofibrilares. Constituem entre 55 e 60 % do total das proteínas do músculo ou seja, 10 % do peso do músculo esquelético do vertebrado. Com base na função fisiológica desempenhada são classificadas em dois grupos: as contráteis e as regulatórias (5, 8).

Proteínas contráteis

As proteínas miofibrilares, actina e miosina, diretamente envolvidas com o ciclo de contração/relaxamento no

músculo vivo, são designadas como contráteis. A miosina e a actina são os maiores componentes dos miofilamentos grosso e fino respectivamente (5, 8).

Miosina

Os miofilamentos grossos dos sarcômeros são principalmente compostos de miosina correspondendo a 43 % da proteína miofibrilar do músculo . Existem cerca de 300 moléculas de miosina por filamento grosso. Diversas evidências experimentais indicam uma grande variação no número de moléculas de miosina por 14,3 nm de repetição axial no miofilamento. Cada molécula tem 160 nm de comprimento e 10 a 13 nm de diâmetro e peso molecular (PM) de 480.000 (5, 135).

A molécula de miosina é composta por duas frações polipeptídicas denominadas cadeias pesadas, cada uma de peso molecular de 200.000 e, três ou quatro pequenas cadeias, as leves. As cadeias leves parecem variar entre espécies, entre o músculo vermelho e o branco e entre o músculo esquelético e cardíaco (5).

A cadeia pesada apresenta conformação de alfa-hélice. Esta dobra-se em espiral sobre si mesma formando a superhélice. Todas as cadeia leves são localizadas exclusivamente na cabeça da miosina desempenhando um importante papel na fisiologia muscular mecanismo este ainda não esclarecido (39, 130).

A miosina apresenta atividade adenosino-trifosfatase (ATP-ase) contendo um sítio para a hidrólise simples do ATP numa das cabeças e, na outra um sítio para a fosforilação (130).

A região da cauda com conformação de alfa-hélice é susceptível a ação enzimática proteolítica (tripsina e quimotripsina) quebrando a molécula em dois segmentos. A parte principal denomina-se meromiosina leve (PM 150.000) e a remanescente, meromiosina pesada (PM 350.000) (5, 130).

Outros estudos demonstraram a presença de múltiplos sítios vulneráveis às proteases . Em condições controladas, a meromiosina pesada é clivada em segmentos menores também susceptíveis à hidrólise enzimática. A principal cabeça globular remanescente é designada sub-fragmento-1 (S-1) e os fibrosos, subfragmentos-2 (S-2) (5).

A molécula de miosina contém mais de 40 resíduos sulfidrila dos quais 12 ou 13 estão localizados em cada subfragmento-1 (5).

Existem algumas diferenças na composição aminoacídica das meromiosinas pesada e leve. A pesada possui maior conteúdo em cisteína, fenilalanina, tirosina e triptofano. A prolina é ausente na leve e não participa na formação da hélice . A miosina provavelmente não forma pontes dissulfeto. A meromiosina pesada contém três aminoácidos não comuns como a metilhistidina, a ϵ -N-monometilisina e a ϵ -N-trimetilisina (5, 39, 130).

Actina

A actina é o maior constituinte do miofilamento fino correspondendo a 22 % da proteína miofibrilar. Existe sob duas formas : a globular (forma G) e a fibrosa (forma F) dependendo

das condições ambientais. Em concentrações salinas fisiológicas, a G-actina polimeriza-se formando a F-actina (5, 39, 130).

A cadeia polipeptídica de actina é composta por 374 resíduos PM 41.785 e 42.300 onde cátions divalentes estão incluídos ao nucleotídeo. A actina é capaz de ligar 1 mol de ATP ou adenosinodifosfato (ADP) a cada nucleotídeo e ainda íons magnésio ou cálcio. O grupo amino terminal da cadeia polipeptídica é representada por ácido aspártico acetilado, enquanto a fenilalanina está presente no grupo ácido terminal (5).

A molécula de actina também contém cinco resíduos sulfidríla distribuídos em diferentes posições onde são ligados os nucleotídeos. A maioria da actina muscular existe sob a forma polimérica (5, 82).

A actina dos músculos esquelético e cardíaco é designada como α -actina enquanto, a dos tecidos não musculares (pulmão e cérebro) de vertebrados superiores é chamada β e γ -actinas (5, 82, 135).

Proteínas regulatórias

As proteínas miofibrilares não diretamente envolvidas na formação de pontes cruzadas mas participantes no ciclo contração/relaxamento são denominadas proteínas regulatórias. Foram divididas em dois grupos : as maiores e as menores (5).

Proteínas regulatórias maiores

A tropomiosina e as troponinas correspondem às proteínas regulatórias maiores. São fornecedoras de cálcio para o sistema contrátil do músculo (5).

Tropomiosina

A molécula de tropomiosina tem 941 nm de comprimento, peso molecular de 66 a 68 kdalton e é composta por dois peptídeos chamados cadeias alfa e beta. Cada cadeia tem conformação de α -hélice consistindo em 284 aminoácidos sendo 3,5 resíduos por volta. As duas cadeias formam a superhélice com nove resíduos em cada alça nas moléculas consecutivas (116, 117).

Diferentes combinações entre as cadeias alfa e beta formam três tipos de tropomiosina (alfa-alfa, alfa-beta e beta-beta). Estas estão relacionadas a diferentes fibras musculares em diferentes espécies (116, 117).

Estudos recentes mostraram a interação entre a tropomiosina e os sítios de ligação da miosina ao filamento de actina como um processo dependente de cálcio (116, 117).

Troponinas

As troponinas no músculo estriado são as únicas proteínas evocadas pela natureza na regulação do processo de contração/relaxamento baseado na mudança da concentração de cálcio intracelular (5).

É composta por dois componentes chamados A e B. O primeiro (A), a proteína receptora de cálcio e a segunda (B) inibidora da interação actino-miosina.

A troponina é formada por três componentes cada qual desempenhando uma função específica na célula viva (5):

Troponina-C: fração ácida pequena com ponto isoelétrico (PI) de 4,1, PM de 17 a 18 kdalton podendo formar um complexo com ions cálcio.

Troponina-I: exibe ação inibitória da interação actino-miosina, é mais básica (PI = 5,5), consistindo de 179 resíduos de aminoácidos e PM 20.864 .

Troponina-T: fração da troponina ligando a tropomiosina com uma peridiocidade de 38,5 nm aos filamentos finos de actina. A troponina-T do músculo esquelético de coelho apresenta 259 resíduos de aminoácidos com PM 30.503.

Proteínas regulatórias menores

Muitas proteínas foram descobertas nos últimos anos. A maioria delas é quantitativamente insignificante mas relacionam-se na regulação da estrutura dos filamentos das miofibrilas e são classificadas como proteínas regulatórias menores. A função específica de cada uma delas ainda não foi bem esclarecida (5).

Estão distribuídas em diferentes partes da ultraestrutura dos filamentos como a linha M (proteína M ou miomesina), a banda A (proteína -C, -F, -H, -I e -X), o disco Z (alfa-actinina, Z-nina e Eu-actinina) e a banda I (beta e gama actininas) (60, 61, 73, 74, 80, 81, 114, 126).

2.1.1.3 - Filamentos e proteínas intermediárias

Diversos autores mencionaram a possível existência de filamentos longitudinais diferentes da actomiosina. Estes parecem conectar os filamentos finos aos lados das linha Z. Alguns pesquisadores denotaram-nos filamentos S. Outros filamentos vistos como ligando os centros dos filamentos grossos a linha Z foram designados filamentos-GAP (5).

A observação da natureza e química dos filamentos intermediários permitiram maiores informações. Estes diferem quimicamente das proteínas contráteis e regulatórias em vários aspectos e, morfologicamente são similares ao colágeno extracelular (5).

Como os filamentos intermediários fortalecem a arquitetura da miofibrila no músculo, são chamadas de proteínas de sustentação ("scaffold ou "backbone proteins"). Estas proteínas representam pontes longitudinais e transversais intrafibrilares. As proteínas incluídas neste grupo são a conectinina (ou titina), a nebulina, a desmina (ou esqueletina), a vimentina e a sinemina (73, 74).

São descritas diversas hipóteses sobre as funções das proteínas de sustentação no músculo vivo. Alguns pesquisadores acreditam que estas proteínas, especialmente a conectinina são responsáveis pela continuidade mecânica ao longo da miofibrila servindo na manutenção da posição da banda A no centro do sarcômero e, ainda provendo elasticidade às miofibrilas (5, 63, 64, 74).

2.1.2 - Proteínas extracelulares

O espaço intersticial das células musculares contém três proteínas de natureza fibrilar chamadas colágeno, reticulina e elastina. São denominadas coletivamente por tecido conectivo o qual contém algumas mucoproteínas e componentes não protéicos como lípidos e diferentes mucopolissacarídeos (ácido hialurônico, sulfato de condroitina A, B e C, queratossulfato e heparina na forma de galactosamina ou glicosamina). Entretanto, as proteínas extracelulares em volta da fibra muscular consistem principalmente de fibras finas reticulares de colágeno constituindo a camada de endomísio. A elastina existe no músculo e está associada ao sangue, aos capilares e ao sistema nervoso (5, 6, 7, 17).

2.1.2.1 - Colágeno

É uma glicoproteína consistindo no principal componente do espaço intersticial. Até 1970, o colágeno de todas as células dos vertebrados era conhecido por ser composto por duas cadeias polipeptídicas denominadas α_1 e α_2 . Isto modificou-se com a descoberta de diversas formas genéticas com diferentes composições químicas das cadeias alfa.

As últimas revisões (5, 6, 7, 79, 107, 108) relatam a existência de dez cadeias cuja biossíntese é controlada por dez genes estruturais. Estas cadeias compõem tipos diferentes de colágeno com distintas estruturas primária e composição aminoacídica.

O colágeno é a maior de todas as moléculas protéicas sendo composta por monômeros de tropocolágeno de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro. A molécula de tropocolágeno é constituída por três cadeias polipeptídicas α , cada uma com PM de 95.000. As cadeias alfa podem ser idênticas ou não dependendo do tipo de colágeno. As moléculas de tropocolágeno tem arranjo relativo às moléculas adjacentes para formar a alça em mais ou menos 3/4 de seu comprimento (5, 6, 7, 17, 79, 107, 108).

Cada cadeia alfa é composta por 1.000 resíduos de aminoácidos formando uma hélice de três aminoácidos por volta no lado esquerdo. No direito forma a superhélice (5, 6, 7).

A composição aminoacídica do colágeno é única com relação a outras proteínas. Todos os tipos são ricos em glicina (33%), prolina (11,7%) e hidroxiprolina (11%), enquanto o triptofano está ausente (5).

Aproximadamente 60 % da molécula consiste em aminoácidos não polares. Os remanescentes 40 % somam 17 % hidroxí, 11 % básicos e 9 % ácidos. Mais ou menos 5 % dos ácidos aspártico e glutâmico são amidados (5).

O colágeno foi classificado segundo suas características histológicas como sendo do epimísio, do perimísio e do endomísio (6, 7).

As ligações cruzadas de colágeno são originadas dos grupos ϵ -NH₂ dos resíduos de lisina (nas regiões terminais não hélicas) que são oxidativamente desaminadas por enzimas cobre dependentes como a lisiloxidase. O aldeído resultante forma uma ligação com outro grupo ϵ -NH₂ da lisina e hidroxilisina presentes nos domínios helicoidais ou não, gerando novas ligações diferentes intra e extramoleculares. A ligação intramolecular foi identificada como alfa, beta-aldol insaturado que liga as três cadeias alfa na molécula.

As ligações intermoleculares são ácido e termo lábeis do tipo aldimina (dehidrohidroxil lisinonorleucina) e termo estável hidroxil-lisino-5-ceto-norleucina. O grupo -CHO derivado da lisina da região terminal não hélica e o grupo ϵ -NH₂ do resíduo hidroxilisina na região da tripla hélice (28 nm da N- ou C-terminal) da molécula ajacente estão envolvidas nas ligações cruzadas intermoleculares (5, 6, 7).

HENRICKSON & ASGHAR (36) discutiram extensivamente sobre a composição e a estrutura do colágeno são também influenciadas por variáveis como a espécie, a raça, o sexo e o estado nutricional do animal.

2.1.2.2 - Reticulina

A reticulina é uma mucoproteína constituinte da rede de fibras da camada do endomísio do músculo. Contém considerável quantidade de lípidos ricos em ácido mirístico. Entretanto, alguns autores consideram a reticulina idêntica ao colágeno enquanto outros diferente (5).

Apresenta algumas características idênticas ao colágeno como a peridiocidade ultraestrutural e a ligação fibrilar cruzada. A descoberta da existência de diversos tipos genéticos de colágeno sugere ser a reticulina o colágeno do tipo III.

2.1.2.3 - Elastina

Também aproxima-se da molécula de colágeno em alguns aspectos. Entretanto, a elastina madura não é hidrolisada por ácidos, bases ou pelo calor. É uma proteína hidrofóbica rica em aminoácidos não polares (glicina, prolina, valina, alanina, fenilalanina, leucina e isoleucina). Não contém hidroxilisina (3, 29, 49).

As ligações cruzadas da desmosina e isodesmosina, únicos aminoácidos presentes na elastina madura, são responsáveis por sua insolubilidade na maioria dos reagentes (3, 5).

A elastina é distinguida química e morfologicamente em dois componentes : o fibrilar e o amorfo. Este último contém alta proporção de aminoácidos polares e um número significativo de ligações dissulfeto cruzadas. Aparece primeiramente no espaço extracelular formando uma rede onde o componente amorfo, composto por 95 % de aminoácidos não polares estão depositados (3, 5).

A fração solúvel da elastina, chamada tropoelastina foi também isolada de animais magros por diversos pesquisadores. É composta por 850 aminoácidos e tem PM 72.000. A sequência aminoacídica da tropoelastina parece ser diferente da do tropocolágeno. Apresenta unidades repetidas do tetrapeptídeo

[Gli-Gli-Val-Pro]_n, do pentapeptídeo [Pro-Gli-Val-Gli-Val]_n e do hexapeptídeo [Pro-Gli-Val-Gli-Val-Ala]_n (5, 29, 30).

2.2 - Efeitos do tratamento térmico sobre as proteínas

O calor afeta a cor, o sabor e o odor, a suculência e a textura da carne e diminui sua população microbiana. Alterações na textura e na suculência devem-se à desnaturação térmica e subsequente associação das proteínas da carne (11, 112, 127).

Os efeitos do tratamento térmico nas propriedades das proteínas do músculo foram objeto de investigação de inúmeros pesquisadores e de revisões feitas por KAUZMANN, 1959 (54), TANFORD, 1968 (122) e 1970 (123), PRIVALOV, 1982 (96), KILARA & SHARKASI, 1986 (57) e FOEGEDING, 1988 (28).

O processo térmico promove algumas modificações nas proteínas como desnaturação, interações proteína-proteína, desenvolvimento de textura e retenção de água.

2.2.1 - Desnaturação protéica

Segundo KAUZMANN, 1959 (54) a desnaturação é um processo no qual o arranjo espacial das cadeias polipeptídicas da molécula passa do estado típico da proteína nativa para o desordenado. Esta alteração pode ser representada como uma transição da estrutura nativa para a desordenada.

São usados métodos analíticos capazes de detectar alterações na estrutura protéica nestes estudos. As técnicas para identificação de estados nativos e desordenados permitem determinar a estabilidade térmica relativa sobre as proteínas e os efeitos das variáveis de processamento como o valor de pH e a força iônica (28, 122, 123).

A avaliação dos dois estados na teoria da desnaturação pode ser feita diretamente por calorimetria. Ainda por procedimento indireto pelo cálculo da entalpia de desnaturação (ΔH) através da constante de equilíbrio usando a equação de Van't Hoff (28).

Em algumas proteínas do músculo como o colágeno, a miosina, a tropomiosina e a troponina ocorre a presença de dois ou mais domínios podendo existir em três ou mais estados desnaturados (28).

Esta propriedade é importante no processamento térmico de alimentos cárneos pois cada molécula desnaturada estruturalmente diferente pode associar-se e produzir efeitos de textura. Ainda, como a estabilidade dos domínios individuais desnaturados pode depender das condições de valor de pH e de força iônica, uma variação nestes pode determinar o patamar de desnaturação atingido (28, 54).

A transição térmica irreversível deve-se à associação das moléculas desnaturadas, à cinética de desdobramento e às modificações nos aminoácidos (28, 54, 57).

A temperatura de processo e o valor de pH usados em alimentos cárneos sugerem a ocorrência de uma modificação mínima nos aminoácidos. A irreversibilidade decorre da associação de proteínas desnaturadas e do lento desdobramento (57).

2.2.2 - Interações proteína-proteína

O processo de agregação ocorre isotermicamente nas proteínas do músculo em temperaturas inferiores à temperatura de desnaturação. A actina e a miosina existem fisiologicamente como filamentos e suas estruturas nativas são susceptíveis às interações proteína-proteína (28, 57, 96).

O estado agregado das proteínas ocorre antes da associação por indução térmica. O processo subsequente de desnaturação e agregação depende de como o complexo nativo afeta o fenômeno da desnaturação. Segundo FOEGEDING (28) na geleificação da miosina o estado associado das moléculas nativas afeta a rigidez do gel e a microestrutura.

A associação da miosina e da actomiosina é tipicamente medida por alterações de turbidez durante o aquecimento. Esta pode ser detectada antes da geleificação. Entretanto a faixa de tempo/temperatura usada deve ser estreita onde a miosina é agregada mas não ocorre precipitação ou geleificação (28, 57, 96, 123).

2.2.3 - Desenvolvimento de textura

A indução térmica leva ao desdobramento e a agregação das proteínas do músculo numa matriz fornecendo às carnes processadas a textura e as propriedades de retenção de água e gordura (28, 54, 57, 122, 123).

Estudos de geleificação utilizam a miosina como proteína modelo. O processo de desenvolvimento da rigidez da miosina inicia-se entre 40 e 50 °C, aumenta a 60 °C e permanece constante entre 60 e 70 °C (28).

A transição exata na faixa de 40 a 70 °C depende da fonte de miosina (frango, peixe, coelho). Em contraste, o maior aumento no desenvolvimento da rigidez inicia entre 50 e 58 °C em sistemas mais complexos como a carne moída de porco, de boi e de peru e, as miofibrilas e o surimi (28).

Estas diferenças refletem as transições combinadas das proteínas individuais, as variações na estabilidade da proteína miofibrilar entre as espécies e o efeito da estrutura miofibrilar residual (28).

O regime de aquecimento usado no processamento térmico tem maior efeito nas propriedades de textura do produto final. Mais especificamente, a faixa de aquecimento afeta a geleificação das proteínas individuais (miosina), as proteínas solúveis em sal (surimi) e os alimentos complexos de carne (embutidos) (28, 57).

No estudo da geleificação das proteínas são usados sistemas modelos individuais. Na investigação da faixa de aquecimento para a geleificação da miosina, do fibrinogênio e da albumina o aquecimento é da forma simples ou combinada. São produzidos géis menos estáveis por aquecimento rápido (70 °C durante 20 minutos) necessitando menor força para rompe-los (28, 96).

Isto contrasta com a estabilidade de géis formados quando as proteínas são aquecidas linearmente a 12 °C/h até 70 °C. A variação na matriz do gel pode ser resultado da associação das proteínas em diferentes estados de desnaturação devido a constituição da miosina e do fibrinogênio por multi-dominios (28, 96).

Os efeitos do regime de aquecimento são também visíveis no processamento de embutidos. Taxas lentas de aquecimento aumentam a força de cisalhamento, a dureza e a força necessária para romper embutidos com 25 % de gordura (28, 57, 122, 123).

As diferenças de textura devem-se às variações na microestrutura produzida pelo aquecimento. A maneira de obtenção das medidas reológicas influe no significado do aquecimento térmico (28).

O aquecimento lento não afeta a rigidez dos embutidos entretanto aumenta a rigidez do surimi. A diferença na composição protéica e conteúdo em gordura nos dois sistemas afetam as propriedades reológicas (28, 57, 96).

A dureza aumenta com a temperatura tanto em embutidos quanto no surimi. Em contraste, com o aumento da temperatura a força para romper e o pico da força de cisalhamento permanecem relativamente constantes ou diminuem entre 65 e 70 °C (28, 96).

Estas observações ilustram a complexidade da relação microestrutura-reologia e as interações proteína-proteína como são citadas na literatura. As propriedades da microestrutura contam para o comportamento de cada parâmetro reológico mas, a relação deve ainda ser melhor estudada (28, 96, 122, 123).

2.2.4 - Propriedades de retenção de água

As propriedades de retenção de água de carnes processadas apresentam as mesmas dificuldades concernentes aos métodos de análise associados aos processos de textura (28).

Métodos analíticos envolvendo a medida do conteúdo de água removida durante o cozimento é conhecido por "grau de cozimento". Outro método de análise indica como água é presa na matriz, envolve a aplicação de alguma forma de força (pressão, força centrífuga) ao gel e a medida do escoamento (28, 54, 57).

Existem em embutidos um mínimo de não cozimento na faixa de 40 a 50 °C devido às alterações térmicas induzidas sofridas pelas proteínas nestas temperaturas. Estas modificações são indicadas pelo aumento na força do gel, na força de quebra e na dureza (28, 57).

O grau de cozimento, a força do gel e a dureza continuam a aumentar na faixa de 60 e 70 °C. Isto mostra uma formação fraca da estrutura do gel entre 40 e 50 °C capaz de reter água. Com o aumento da temperatura ocorre maior desdobramento e interação protéica. A microestrutura torna-se capaz de resistir ao estresse apesar da capacidade em reter água (122, 123).

A retenção de água dos embutidos contra a força centrífuga diminui de 55 a 70 °C. Outros fatores como a razão gordura-proteína e umidade relativa também apresentam efeitos na taxa de perda de água (28, 54, 96, 122, 123).

2.3 - Efeitos do tratamento enzimático sobre as proteínas

As reações catalisadas por enzimas tem sido incidentalmente utilizadas no processamento de alimentos desde há muitos anos. As enzimas sendo parte integrante do alimento, podem ser extraídas destes ou obtidas de microrganismos (14, 132, 134).

A adição de preparações enzimáticas de origem animal, vegetal ou especialmente de microrganismos tem utilização recente (27, 33, 105).

Esses aditivos intencionais dão uma série de vantagens à indústria: especificidade ao substrato; alta velocidade de reação em condições suaves de trabalho (temperatura e valor de pH); permitem processo controlado, rápido e contínuo com custo operacional e investimento modestos (14, 40, 132, 134).

A utilização de enzimas proteolíticas em processos industriais tem sua aplicação descrita por diversos autores tendo o seu uso comercial aumentado sobremaneira (1, 9, 10, 11, 13, 27, 33, 132, 133, 134).

O alto custo por unidade de peso (129) sugere a busca de aplicações diretas da enzima "in natura" sem a necessidade de isolamento e de purificação.

As enzimas com atividade proteolítica (hidrolases peptídicas) são as mais importantes para a indústria de alimentos. Derivam da classe das hidrolases e dividem-se em quatro grupos (14, 34):

- proteases serínicas (E.C.3.4.21): incluem a tripsina, a quimotripsina, a elastase e a subtilisina; São inibidas por difluoreto de isopropila. Essas endopeptidases contém o grupo imidazol como sítio ativo;

- proteases sulfidrílicas (E.C. 3.4.22): 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 seqüência aminoacídica em torno de resíduos cisteinil e histidil do sítio ativo ;

- proteases ácidas (E.C. 3.4.23): incluem a pepsina e a renina; necessitam de baixo valor de pH como ótimo; e,

- metaloproteases (E.C. 3.4.24): 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.

O processo de hidrólise consiste basicamente na quebra da ligação peptídica. A complexidades das proteínas torna difícil o estudo de suas etapas (40, 93, 132).

A enzima é capaz de atacar ligações disponíveis considerando-se sua especificidade aos aminoácidos e algumas condições ideais como a temperatura e o valor de pH (40, 132, 134).

A hidrólise enzimática modifica as propriedades funcionais das proteínas: aumenta a solubilidade e a capacidade de emulsificação, afeta na retenção e na incorporação de ar e, desenvolve sabor amargo (1, 47, 56, 66, 76, 77, 86, 93).

Aplicações de processos enzimáticos na modificação das proteínas visam a produção de pequenos peptídeos ou aminoácidos para uso em produtos dietéticos e, ainda como agentes flavorizantes (53, 56, 66, 85, 93).

Exemplos do uso industrial de enzimas são: a modificação das propriedades reológicas do glúten da farinha de trigo por proteases em produtos de confeitaria; a coagulação da caseína pela renina e quimosina na indústria do leite; a maturação e o amaciamento da carne por enzimas de origem vegetal (89, 106); o

desenvolvimento de cor da cerveja por sedimentação enzimática de proteínas (72) e, a produção parcial ou completa de hidrolisados protéicos (9, 10, 11, 110, 111, 113).

As enzimas chamadas bromelinas são encontradas nos tecidos das plantas da família Bromeliacea das quais o abacaxi Ananas comosus é o melhor conhecido (26, 35, 46, 65, 67, 84, 109, 124).

A enzima proteolítica encontrada no suco extraído da polpa da fruta foi primeiramente descrita por CHITTENDEN (26, 84) sob o nome de bromelina. Tem número sistêmico EC 3.4.3.24.

Segundo HEINICKE (35) o suco é uma mistura complexa de materiais em suspensão: grãos de amido, cristais de oxalato de cálcio e resíduos, e materiais solúveis como açúcar, sais, polissacarídeos complexos, proteínas e lipídeos.

O teor de nitrogênio total no suco de abacaxi é muito constante e situa-se em torno de 500 mg/l. O nitrogênio encontra-se na forma nítrica e amoniacal e em pequena proporção na forma orgânica: proteína, peptídeos e aminoácidos (46).

A determinação da atividade enzimática em fluidos biológicos de animais e de plantas está se tornando importante especialmente nos alimentos, na agricultura e nas químicas forense e clínica (27).

EL-GHARBAWI & WHITAKER (26), separaram a bromelina da polpa em cinco componentes com atividade proteolítica. Todos os componentes tem máxima atividade a valor de pH 8,5 a 35 °C. O número I tem máxima atividade a valor de pH 6,0 apresentando um segundo pico a 8,5. O IV também tem um segundo pico a pH 7,0.

Todos os cinco componentes tem aproximadamente a mesma atividade específica sobre a caseína em valor de pH 7,0. A razão pela qual os componentes apresentam dois valores de pH ótimo não está esclarecida.

A presença de mais de um valor ótimo de pH é considerado em geral devido à presença de mais de uma enzima. A enzima pode atuar em substrato heterogêneo como a proteína e, o múltiplo ótimo de pH seria um reflexo das taxas relativas as quais algumas ligações selecionadas no substrato são rompidas em diferentes valores de pH (26, 35).

Em estudos realizados por LIMA (68) a bromelina extraída de caules de abacaxis var. pérola apresentou-se estável em uma faixa de pH entre 3,0 e 8,0 sendo que seu valor de pH ótimo de atividade sobre a caseína situou-se entre 6,0 e 7,0.

A estabilidade dos diferentes componentes quando mantidos a 55 °C é distinta. O grau de estabilidade térmica decresce na seguinte ordem : I, V, III, IV e II (26).

Segundo TISSEAU (124), a atividade da bromelina bruta obtida de resíduos de abacaxi permanece estável até 55 °C, caindo rapidamente com o aumento da temperatura. LIMA (68) encontrou um

ótimo de atividade de 50 °C e a energia de ativação foi de 9.660 cal/mol.

MOORE & CAYGILL (83), constataram que a atividade da bromelina no fruto é mais elevada em alguns cultivares de abacaxi do que em outros e também nas porções suculentas do fruto. Embora a atividade decresça significativamente na maturação, os níveis são razoavelmente altos no suco maduro comumente utilizado no processamento.

A atividade enzimática relaciona-se com a localidade, a variedade, a parte e a idade da planta (46, 83). A atividade decresce com a madureza da fruta.

As preparações comerciais são obtidas do caule pois a enzima deste apresenta maior atividade (120, 124).

O comportamento eletroforético da bromelina da polpa é complexo apresentando de cinco a oito bandas eletroforeticamente distintas. Contém diversas proteases diferindo umas das outras na ação a diferentes substratos, na susceptibilidade a agentes de oxidação e de redução e especialmente no valor de pH no qual hidrolisa o substrato mais rapidamente (26).

2.4 - Resistência térmica de Bacillus stearothermophilus

Os esporos de Bacillus stearothermophilus são usados extensivamente como indicadores da eficácia de processos de esterilização (12, 78, 95, 90, 92, 118, 119).

O primeiro estudo da resistência térmica de bactérias ou de esporos a temperaturas superiores a 100 °C foi relatado por BIGELOW & ESTY, 1920 (16). Desde então, inúmeros procedimentos de aquecimento de suspensões bacterianas em banho de óleo tem sido descritos (12, 19, 20, 22, 23, 43, 48, 94).

Em 1952, STERN & PROCTOR (115), demonstraram que uma suspensão de pequeno volume (0,01 ml) colocada num tubo capilar de parede fina (0,08 mm de diâmetro interno) teria penetração térmica de um cilindro infinito.

O sistema quando utilizado para estudos de resistência térmica de microrganismos teria a vantagem de necessitar tempos de aquecimento e resfriamento curtos. Desta forma, a transmissão de calor para atingir a temperatura de tratamento no momento da imersão dos tubos no meio de aquecimento pode ser considerada instantânea (20, 115, 118, 119).

A concentração hidrogeniônica do substrato submetido ao aquecimento tem efeito na resistência térmica do microrganismo. O aumento da acidez em geral diminui a resistência das bactérias ao calor (118, 119).

O meio de cultura de enumeração influe na recuperação de esporos estressados (71). Segundo BHATT, 1987 (15) o amido atua como fator favorável à germinação destes.

A associação do amido ao meio de cultura permite uma melhor regeneração dos protoplastos de diferentes espécies de Bacillus stearothermophilus (15, 21). O efeito positivo da presença de amido na germinação dos esporos deve-se a formação de uma camada protetora isto é, a membrana não está protegida eficazmente pela parede.

Considerando-se a morte dos esporos como logaritmica obedecendo a uma reação de primeira ordem (37, 38, 98, 118, 119) é possível calcular os valores dos tempos de redução decimal , D, a partir do número inicial de microrganismos e de sobreviventes, após um tempo definido de tratamento térmico para cada temperatura estudada.

Diversos fatores afetam a resistência térmica de bactérias. O ambiente químico onde a célula bacteriana é submetida ao calor afeta sua resistência térmica (37, 38, 118, 119). Dentre estes, encontram-se o valor de pH, a concentração de cloreto de sódio, de açúcares e de outros glicídeos, a presença de gorduras, de agentes de cura e o conteúdo em água.

III - OBJETIVOS

O objetivo do presente é a otimização do processo biotecnológico de hidrólise da proteína da carne bovina pela bromelina.

A otimização é feita em base de tratamentos estatísticos dos resultados experimentais para se desenvolver modelos.

A finalidade é elaborar um produto conservado para utilização em dietas.

IV - Material, métodos e parte experimental

4.1 - Material

4.1.1 - Enzimas

Utilizou-se como fonte de bromelina (E.C. 3.4.22.5) o suco "in natura" de abacaxi maduros Ananas comosus L. variedades havaí e pérola e, uma solução a 1 % em água destilada da enzima comercial bruta, conforme é vendida no mercado (650 Unidades Kunitz).

4.1.2 - Carne

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

4.1.3 - Equipamentos de laboratório

- Agitador de tubos Phoenix, mod.AT56
- Agitador magnético com aquecimento Fisatom, mod.706A
- Balança analítica Sauter, mod. 404/11
- Balança semi-analítica Marte, mod.A-1000
- Balança Filizola
- Banho colora Ultrathermostat tipo KLZ 42.60-284D
- Banho-maria com temperatura controlada Fabbe, mod. 169
- Banho-maria com temperatura controlada Fanem, mod.102/1

- Banho-maria com temperatura controlada Fanem, mod. 100
- Bastões de vidro (comprimento 250 mm) com extremidade esférica (diâmetro 13-15 mm)
- Câmara frigorífica Mecalor
- Centrífuga refrigerada IEC-International Centrifuge Universal, mod. UV
- Centrífuga doméstica
- Cesto de aço inox
- 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 Heraeus tipo FT 420
- Fluxo laminar VECO, mod.VLH 12
- Frascos para centrifugar autoclaváveis
- Freezer vertical Brastemp 270 l
- Geladeira Prosdócimo 340 l
- Microscópio Karl-Zeiss
- Moedor de carnes Hobart
- Pinças pequenas
- Pipetas Pasteur estéreis
- Pipeta automática Socorex de 25 ul
- Pipetas estéreis de 1 e 10 ml
- Placas de Petri (diâmetro 90 e 140 mm)
- Potenciômetro Metrohm Herisau mod. E 520
- Potenciômetro Micronal, mod. B375
- Refratômetro Atago mod. CAT-325
- Registrador Sargent-Welch CG, mod. SRG
- Termostato Mettler TM 15

- Tubos capilares INLAB (cod. 01501)
- Tubos de ensaio de 16 x 160 mm
- Tubos de vidro com tampa de rosca
- Ultrassom Microsonic (mod. SX 20)
- Vidraria e materiais comuns de laboratório

4.1.4 - Reagentes analíticos e soluções reagentes

4.1.4.1 - Reagentes analíticos

- Ácido clorídrico concentrado
- Acetona (Merck 14)
- Agar-agar
- Albumina bovina, fração V (Sigma)
- Amido solúvel (Reagen 0101-5514)
- Carbonato de sódio anidro
- Caseína Nacht
- Cloreto de sódio
- Dextrose tryptone agar (DIFCO 0080-17)
- Etanol
- Extrato de carne
- Hidróxido de sódio
- Óleo linha automotiva 20/40
- Peptona
- Reativo de Folin-Ciocalteu (QEEL)
- Sulfato cúprico anidro
- Tartarato duplo de sódio e potássio
- Triptona

4.1.4.2 - Soluções reagentes

a - Solução alcalina

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

b - Solução de sulfato cúprico

Sulfato cúprico anidro	2	g
Agua destilada	100	ml

c - Solução de tartarato de sódio e potássio

Tartarato duplo de sódio e potássio	4	g
Agua 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 - Azul de metileno

Solução a

Azul de metileno	0,3 g
Alcool 95 %	30 ml

Solução b

Hidróxido de sódio	10 ml
Agua destilada	100 ml

Misturar a e b

g - Solução desinfetante para capilares

Alcool etílico	90 ml
Acido clorídrico concentrado	10 ml

4.1.5 - Meios e diluentes

4.1.5.1- Meio de esporulação para Bacillus
stearothermophilus

Preparado de acordo com HERSON & HULLAND, 1981 (38) com modificações.

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,005 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada	1.000 ml

Ajustar a valor de pH = 7,3 e esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Distribuir em placas de Petri. Sem o agar o meio serve como caldo de esporulação.

4.1.5.2- Meio de enumeração

O meio de cultura agar triptona dextrose acrescido de 0,2 % de amido solúvel foi preparado segundo as instruções do fabricante.

4.1.5.3 Diluente triptona-sal

Triptona	1,0	g
NaCl	8,5	g
Agua destilada	1.000	ml

Ajustar a valor de pH 7,0, distribuir 10 ml em tubos com tampa de rosca e 9 ml em tubos de vidro de 16 x 160 mm e esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

4.1.6 - Cepas

Utilizou-se cepa de Bacillus stearothermophilus FS 1518 fornecido pelo Laboratório de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, São Paulo.

4.2 - Métodos

4.2.1 - Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da bromelina foi determinada segundo método preconizado por MURACHI (84) com modificações. Após ativação da enzima por 5 minutos em banho-maria a temperatura desejada acrescentou-se uma solução de caseína a 1%, a valor de pH 7,0. Decorridos 10 minutos para a digestão adicionou-se ácido tricloroacético e, filtrou-se. A caseína solúvel foi medida pelo método de LOWRY (69) no comprimento de onda de 660 nm.

A comparação entre as absorbâncias e a concentração de proteína foi feita através de uma curva padrão (Figura 1) obtida por regressão linear simples utilizando-se soluções de albumina bovina em concentrações crescentes, segundo o esquema:

tubo n.	sol.prot. (ug/ml)	mist.reat. (ml)	reat.Folin (ml)	absorbância
0	0	5,0	0,5	0,000
1	40	5,0	0,5	0,014
2	80	5,0	0,5	0,038
3	120	5,0	0,5	0,049
4	160	5,0	0,5	0,070
5	200	5,0	0,5	0,089
6	240	5,0	0,5	0,100
7	320	5,0	0,5	0,130
8	400	5,0	0,5	0,168

Figura 1 : Curva de referência para a dosagem de proteínas pelo método de LOWRY. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

A correspondência entre os valores obtidos experimentalmente definem a seguinte equação:

$$F(x) = 0,001023 + 0,000416 (x) \quad r = 0,998 \quad p = 0,00$$

onde : $F(x)$ = absorbância

x = concentração de proteína (ug/ml)

r = coeficiente de correlação linear

p = nível descritivo

4.2.2 - Determinação do número de graus Brix

Os números de graus Brix do suco de abacaxi foram medidos em refratômetro Atago.

4.2.3 - Determinação do valor de pH

O valor de pH do suco de abacaxi e do hidrolisado foram medidos em potenciômetro Metrohm Herisau segundo recomendações propostas por HOFMANN (42).

4.2.4 - Determinação da concentração de sólidos solúveis

A determinação da concentração de sólidos solúveis do hidrolisado de carne foi feita por interpolação em uma curva padrão (Figura 2) 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 (111).

A correspondência entre concentração de sólidos e graduação da escala foi feita pela equação :

$$y = 1,0308 - 1,2426 x \quad r = 0,998 \quad p = 0,00$$

onde : y = leitura na escala

x = concentração de sólidos solúveis (g/100g)

r = coeficiente de correlação linear

p = nível descritivo

4.2.5 - Determinação da resitência térmica de esporos de Bacillus stearothermophilus

4.2.5.1 - Esporulação

A esporulação de Bacillus stearothermophilus foi feita segundo o método preconizado por STUMBO (119).

Esporos de Bacillus stearothermophilus foram suspensos em tubo contendo 5 ml de água destilada estéril, ativadas por calor a 100 °C por 15 minutos em banho-maria fervente e a seguir resfriadas em banho de gelo.

Figura 2 : Curva de referência para a interpolação da leitura na escala do refratômetro da concentração de sólidos solúveis. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Foram inoculados 0,1 ml da suspensão ativada em tubos inclinados contendo 20 ml de meio de esporulação (item 4.1.5). Os tubos foram incubados a 55 °C por 48 horas em posição vertical.

Após 48 horas foi retirado o crescimento da superfície utilizando-se 2 ml de água destilada estéril. Ativou-se por calor a 100 °C por 15 minutos e resfriou-se em banho de gelo por 2 minutos.

Inoculou-se 0,2 ml da suspensão ativada em placas de Petri contendo 30-40 ml de meio de esporulação (item 5.1). Espalhou-se o inóculo na superfície com bastão de vidro estéril e secou-se em câmara de fluxo laminar por 20 minutos.

As placas foram incubadas a 55 °C invertidas em grupos de 13 em dessecador durante pelo menos 48 horas.

As placas foram resfriadas a 4 °C por 4 horas antes de proceder-se a coleta dos esporos.

Coleta de esporos

A cada tubo adicionou-se 5 ml de água destilada estéril, movendo-o lateralmente até o desprendimento da cultura. Com alça de platina estéril o crescimento foi retirado cuidando-se para não riscar o meio. Coletou-se e distribuiu-se homogeneamente a suspensão crua em tubos de centrifuga e estocou-se sob refrigeração antes da limpeza.

Limpeza de esporos

Centrifugou-se a 6.000 g por 10 minutos e retirou-se o sobrenadante eliminando-se assim os resíduos de meio. Foi retirada uma amostra e ressuspendida adicionando-se 5 ml de água estéril.

O tubo contendo a suspensão foi colocado em béquer com água aplicando-se a seguir 3 minutos de ultrassom.

Procedeu-se à observação microscópica dos esporos após coloração com azul de metileno até indicação da eliminação das células vegetativas ou esporulação superior a 95 %.

Completoou-se a suspensão até 30 ml com água destilada estéril e estocou-se a 4 °C.

4.2.5.2 - Preparação dos capilares

Inoculou-se 5 ml da suspensão de esporos de 10^6 UFC em 50 ml do hidrolisado preparado e estocou-se a 4 °C. No momento do experimento submeteram-se 2 ml do inóculo a tratamento a 80 °C por 10 minutos seguido de resfriamento em banho de gelo a fim de eliminarem-se as células vegetativas.

Com o auxílio de uma pipeta automática foram distribuídas assepticamente 25 ul das suspensões nos capilares. A seguir foram selados à chama.

4.2.5.3 - Tratamento térmico

A resistência térmica de esporos de Bacillus stearothermophilus foi medida pelo método de STERN & PROCTOR (115) com modificações.

Utilizaram-se dois tubos capilares inoculados para cada tempo de aquecimento, dispostos horizontalmente em cesto de aço inoxidável mergulhado em banho de óleo agitado, termostaticamente controlado.

Foram utilizados tempos diferentes de amostragem para cinco temperaturas em estudo segundo o esquema apresentado no seguinte quadro:

temperatura (°C)	valor de pH	tempo de amostragem (min)					
109	5,6	0	18	32	64	78	108
	6,6	0	18	48	72	84	120
112	5,6	0	6	18	24	32	64
	6,6	0	9	18	24	48	72
115	5,6	0	1	2	3	4	5 6
	6,6	0	3	6	9	12	18
118	5,6	0	2	4	6		
	6,6	0	3	6	12	18	
121	5,6	0	0,5	1,0	1,5		
	6,6	0	1,5	3,0	4,5		

Decorrido o tempo de tratamento térmico os capilares foram resfriados em banho de água/gelo a temperatura de 5 °C, desengordurações em acetona e desinfetados em solução de etanol/ácido clorídrico concentrado (solução g).

Os capilares foram quebrados em frascos plásticos com auxílio de bastão com extremidade esférica em solução diluente triptona/sal.

Procedeu-se ao plaqueamento em meio de enumeração (item 4.1.5) agar triptona dextrose acrescido de 0,2 % de amido. As culturas foram incubadas a 55 °C por 48 horas para efeito de contagem.

4.2.5.4 - Cálculo dos parâmetros D e Z

Os diferentes parâmetros (D e Z) foram calculados a partir dos dados experimentais por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados segundo as definições:

Tempo de redução decimal = Valor D

E o tempo necessário para destruir a uma dada temperatura, 90 % dos esporos ou células vegetativas de um dado organismo, ou numericamente igual ao número de minutos necessários para transcorrer um ciclo logaritmo na curva de sobreviventes. Matematicamente igual ao inverso do coeficiente angular da equação da curva de sobreviventes (37, 38, 95, 118, 119).

Resistência do microrganismo a diferentes temperaturas
- Valor Z

E o aumento necessário na temperatura para reduzir à décima parte o tempo de redução decimal (valor D) ou o número de graus C necessários para transcorrer um ciclo logaritmo na curva de destruição térmica. Matematicamente igual ao inverso ao do coeficiente angular da equação da curva de destruição térmica (37, 38, 95, 118, 119).

Utilizou-se o programa estatístico Statgraphics versão 2.7.

4.2.6 - Análise estatística

Foi empregada a técnica de análise de variância (136) com caráter inferencial para comparação das médias de atividade enzimática da bromelina sobre a caseína e, da concentração de sólidos solúveis da carne bovina.

Empregou-se o Teste de Tukey para o estudo das comparações múltiplas entre as médias onde os valores F foram significativos.

A análise foi conduzida por meio do programa estatístico Statgraphics versão 2.7. Em todas as análises consideradas utilizou-se um nível de significância de 5 %.

4.2.7 - Determinação das condições ótimas de operação

O ajuste do modelo matemático foi feito pelo método da superfície de resposta segundo BOX et col. (18).

O cálculo dos coeficientes das variáveis foi feito com auxílio do programa Statgraphics versão 2.7 bem como a representação das superfícies de resposta e dos contornos das equações.

Os pontos de máximo foram calculados por análise canônica a partir dos modelos ajustados de segundo grau de acordo com AKHANAZAROVA & KAFAROV (2).

4.3 - Parte experimental

4.3.1 - Preparo da enzima

Utilizou-se bromelina de suco de abacaxi Ananas comosus L. cultivares pérola e havaí e solução a 1 % da enzima bruta.

Os abacaxis foram lavados, pesados, descascados e cortados em tiras. Após a extração, realizada em centrífuga de uso doméstico, o suco foi peneirado e pesado. Determinou-se o valor de pH , o número de graus Brix e a atividade enzimática.

Foram estudados os efeitos do valor de pH (3,0, 4,0, 4,8, 6,5, 7,0 e 8,5) e da temperatura (40, 50, 60, 70, e 80 °C), para cada um dos tipos de enzima (havaí, pérola e bruta), na atividade da bromelina sobre a caseína resultando em um experimento de combinação fatorial 6 x 5. Os experimentos foram feitos em triplicata totalizando 90 amostras para cada tipo de enzima.

O valor de pH do suco de abacaxi e das soluções enzimáticas foram ajustados pela adição de quantidades adequadas de ácido clorídrico e hidróxido de sódio.

4.3.2 - Preparo da carne

A carne foi submetida a tratamento prévio para retirada de gordura visível e aponevroses e a seguir moída em moedor Hobart.

4.3.3 - Hidrólise

A matéria-prima moída e o suco foram colocados em bēquer de 400 ml na proporção de 1:1 (p/p) e, homogeneizadas. Retirou-se uma amostra e determinou-se o valor de pH inicial. Filtrou-se e determinou-se a concentração inicial de sólidos solúveis.

Após estabilização da temperatura procedeu-se à hidrólise em banho-maria a temperatura controlada durante 30 minutos sob agitação constante. No final, as amostras foram levadas a banho-maria fervente durante 15 minutos com a finalidade de inativação enzimática.

Em seguida determinou-se o valor de pH do hidrolisado integral. As amostras foram filtradas à vácuo em funil de Buchner. A partir do hidrolisado filtrado, verificou-se na escala do refratômetro a concentração final de sólidos solúveis.

Foram estudados os efeitos da temperatura (40, 50 e 60 °C) e do tipo de enzima (pérula, havaí, bruta) na concentração de sólidos solúveis do hidrolisado resultando num experimento de combinação fatorial 3 x 3. Os experimentos foram feitos em duplicata totalizando 18 amostras.

4.3.3 - Parâmetros de resistência térmica de Bacillus stearothermophilus

O estudo de conservação térmica de hidrolisado de carne foi feita determinando-se os parâmetros de resistência térmica de Bacillus stearothermophilus pelo método dos tubos capilares.

Foram estudados os efeitos dos valores de pH 4,5, 5,6 e 7,0 nos parâmetros de resistência térmica do microrganismo.

Em ensaio preliminar ao tratamento térmico inoculou-se 5 ml da suspensão do microrganismo em 50 ml do hidrolisado de carne nos valores de pH 4,5, 5,6 e 7,0 e incubou-se a 55 °C durante 48 horas. Procedeu-se à contagem após plaqueamento antes e depois da incubação.

4.3.4 - Condições ótimas de operação

Com a região experimental pré-estabelecida pelo projeto fatorial 6 x 5 com três repetições (item 4.3.1) o próximo passo será a busca do ponto ótimo de operação.

Para este fim, empregou-se a metodologia da superfície de resposta que consiste de um conjunto de técnicas usadas no relacionamento de uma ou mais variáveis respostas de variáveis dependentes (atividade enzimática de bromelina e concentração de sólidos solúveis) em função de variáveis independentes (temperatura e valor de pH) e com isso estimar o efeito das variáveis independentes em uma ou mais respostas examinadas.

A primeira fase da experimentação consiste na elaboração de um projeto de primeira ordem empregando-se um projeto fatorial 2^2 com três pontos centrais. Estes últimos tem por objetivo estimar o erro experimental e a curvatura do modelo ($b_{11} + b_{22}$), realizando-se ensaios como mostra o seguinte esquema e a matriz de ensaios:

experimento	variáveis nas unidades codificadas		y1
	x1	x2	
1	-1,00	-1,00	
2	+1,00	-1,00	
3	-1,00	+1,00	
4	+1,00	+1,00	
5	0,00	0,00	
6	0,00	0,00	
7	0,00	0,00	

Os níveis das variáveis em unidades codificadas são :

$$x1 = \frac{T - 60}{20} \quad \text{e} \quad x2 = \frac{\text{pH} - 5,75}{2,75}$$

onde: x1 = temperatura (°C)

x2 = valor de pH

Os resultados dos experimentos permitem o ajuste e a verificação (ou cheque) de um modelo polinomial de primeiro grau, mediante a avaliação da significância dos coeficientes b_{12} (da interação $x1.x2$) e a somatória $b_{11} + b_{22}$, de $x1^2$ e $x2^2$.

Se existe evidência de significância destes três coeficientes, nesta região, sugere-se a elaboração de um projeto composto rotacionável com os seguintes esquema e matriz de ensaios:

experimento	variáveis nas unidades codificadas		y1
	x1	x2	
1	-1,00	-1,00	
2	+1,00	-1,00	
3	-1,00	+1,00	
4	+1,00	+1,00	
5	0,00	0,00	
6	0,00	0,00	
7	0,00	0,00	
8	-1,41	0,00	
9	+1,41	0,00	
10	0,00	-1,41	
11	0,00	+1,41	
12	0,00	0,00	
13	0,00	0,00	
14	0,00	0,00	

Assim, fez-se o ajuste do modelo polinomial de segunda ordem, tipo:

$$\hat{y} = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{12} x_1 x_2$$

onde: $\hat{y}$ = variável resposta

x_1 = temperatura (°C)

x_2 = valor de pH

O ajuste da equação de segundo grau que melhor representa o fenômeno é feito pelo método dos mínimos quadrados e os parâmetros deste ajuste (R^2 , F e p) são mostrados pela análise de variância.

A representação tridimensional da superfície de resposta do modelo polinomial de segundo grau, indica a natureza do ponto ou da linha estacionários.

A forma canônica do polinômio de segundo grau é mais claramente interpretada pelo pesquisador, por meio dos sinais e dos valores dos coeficientes da equação na forma canônica:

$$\hat{Y} - Y_S = \lambda_{11} X_1^2 + \lambda_{22} X_2^2$$

onde : Y_S = coordenadas de Y no ponto estacionário

X_1 e X_2 = coordenadas canônicas

A transformação canônica consiste em uma translação e rotação dos eixos originais de modo a se obter uma superfície simétrica com ponto (S) ou linha estacionária bem definidos (2, 18).

V - Resultados e discussão

5.1 - Enzima

O suco de abacaxi "in natura" apresenta valor de pH médio igual a 3,8 e um número de graus Brix médio de 10,5, valores estes concordantes com os da literatura verificada (46).

As atividades sobre a caseína de solução a 1 % de bromelina bruta em função do valor de pH e da temperatura são apresentadas na Tabela 1 e Figura 3.

As médias, os erros padrão e os intervalos de confiança para a atividade sobre a caseína de solução a 1 % de bromelina bruta em função do valor de pH e da temperatura podem ser vistos na Tabela 2.

Os resultados da análise de variância mostram o efeito de interação entre o valor de pH e a temperatura na atividade sobre a caseína de solução a 1 % de bromelina bruta significativo estatisticamente ($p = 0,00$) (Tabela 3).

Os valores F obtidos na análise de variância foram de 31,40 para o efeito do valor de pH e, de 431,00 para a temperatura. Logo os efeitos são significativos estatisticamente ($p = 0,00$) (Tabela 3).

Tabela 1 : Atividades (ug/ml.min) sobre a caseína de solução a 1 % de bromelina em função da temperatura e do valor de pH para o projeto fatorial 6 x 5 com três repetições.

valor de pH	temperatura (°C)				
	40	50	60	70	80
3,0	267,66	448,89	245,86	310,13	130,01
3,0	253,13	482,78	274,92	288,34	124,43
3,0	274,92	453,73	260,39	302,87	129,27
4,0	260,39	453,32	122,38	288,34	395,62
4,0	267,66	482,78	136,91	310,13	473,10
4,0	274,92	482,78	136,91	288,34	400,46
4,8	245,86	444,04	115,11	302,87	569,95
4,8	260,39	453,73	129,64	302,87	608,69
4,8	253,13	424,67	136,91	302,87	637,75
6,5	260,39	463,41	180,49	295,60	560,27
6,5	274,92	463,41	144,17	317,40	540,89
6,5	289,45	473,10	180,49	310,13	521,52
7,0	253,13	424,67	224,07	288,34	376,25
7,0	253,13	405,30	260,39	295,60	395,62
7,0	245,86	424,67	224,07	317,40	444,04
8,5	231,34	434,36	325,77	222,96	172,86
8,5	253,13	453,73	311,24	302,87	187,38
8,5	253,13	453,73	311,24	186,65	187,38

Tabela 2 : Médias, erros padrão e intervalos de confiança para as atividades sobre a caseína de solução a 1% de bromelina bruta em função do valor de pH e da temperatura.

nível	num. obs.	média	erro padrão	intervalo de confiança	
<hr/>					
valor de pH		317,84			
3,0	15	283,16	28,71	272,83	293,48
4,0	15	318,27	32,58	307,95	328,59
4,8	15	345,90	44,03	335,57	356,22
6,5	15	351,71	36,10	341,38	362,03
7,0	15	322,17	20,86	311,84	332,49
8,5	15	285,85	25,13	275,53	296,17
temperatura		317,84			
40	18	259,59	3,21	250,16	269,01
50	18	451,28	5,23	441,86	460,71
60	18	206,72	17,14	197,30	216,14
70	18	290,76	7,83	281,34	300,19
80	18	380,86	42,58	371,44	390,28
valor de pH x temp.		317,84			
3,0	40	3	265,24	6,41	242,15
3,0	50	3	461,80	10,58	438,72
3,0	60	3	260,39	8,39	237,31
3,0	70	3	300,45	6,41	277,36
3,0	80	3	127,90	1,75	104,82
4,0	40	3	267,66	4,19	244,57
4,0	50	3	472,96	9,82	449,88
4,0	60	3	132,07	4,84	108,98
4,0	70	3	295,60	7,26	272,52
4,0	80	3	423,06	25,06	399,98
4,8	40	3	253,13	4,19	230,04
4,8	50	3	440,81	8,54	417,73
4,8	60	3	127,22	6,41	104,14
4,8	70	3	302,87	0,00	279,79
4,8	80	3	605,46	19,64	582,38
6,5	40	3	274,92	8,39	251,84
6,5	50	3	466,64	3,23	443,56
6,5	60	3	168,38	12,11	145,30
6,5	70	3	307,71	6,41	284,63
6,5	80	3	540,89	11,19	517,81
7,0	40	3	250,71	2,42	227,63
7,0	50	3	418,21	6,46	395,13
7,0	60	3	236,18	12,11	213,09
7,0	70	3	300,45	8,73	277,36
7,0	80	3	405,30	20,16	382,22
8,5	40	3	245,87	7,26	222,78
8,5	50	3	447,27	6,46	424,19
8,5	60	3	316,08	4,84	293,00
8,5	70	3	237,49	34,33	214,41
8,5	80	3	182,54	4,84	159,46
total	90	317,84	2,11	313,63	322,06

99.

Tabela 3 : Efeitos do valor de pH e da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) na análise de variância para atividade (ug/ml.min) sobre a caseína de solução a 1 % de bromelina bruta.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	G. L.	Quadrado médio	F	Nível descritivo
Efeitos principais	751.252,05	9	83.472,45	209,04	0,00
valor de pH	62.694,73	5	12.538,95	31,40	0,00
temperatura	688.557,32	4	172.139,33	431,10	0,00
Interações	588.257,69	20	29.412,88	73,66	0,00
valor de pH x temperatura	588.257,69	20	29.412,88	73,66	0,00
Resíduo	23.958,46	60	399,31		
Total	1.363.468,20	89			

G.L. : graus de liberdade

Figura 3 : Atividades médias sobre a caseína de solução a 1% de bromelina bruta em função do valor de pH e da temperatura.

A Tabela 4 mostra a análise de comparações múltiplas pelo método de Tukey das médias das atividades sobre a caseína da solução a 1 % da bromelina bruta segundo os efeitos de valor de pH e da temperatura.

O máximo de atividade sobre a caseína foi observada a valor de pH 6,5 decrescendo na seguinte ordem 4,8; 7,0; 4,0; 8,5 e 3,0. As atividades são consideradas estatisticamente homogêneas nos valores de pH 3,0 e 8,5 (Tabela 4, Figura 4).

As médias das atividades sobre a caseína obtidas nas diferentes temperaturas atingem um máximo a 50 °C decrescendo na seguinte ordem 80, 70, 40 e 60 °C (Tabela 4, Figura 5).

A Tabela 5 e a Figura 6 apresentam os efeitos do valor de pH e da temperatura nas atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. pérola.

As médias, os erros padrão e os intervalos de confiança para a atividade sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. pérola em função do valor de pH e da temperatura podem ser vistos na Tabela 6.

Os resultados da análise de variância mostram o efeito de interação entre o valor de pH e a temperatura nas atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. pérola significativo estatisticamente ($p = 0,00$) (Tabela 7).

Tabela 4 : Análise de comparações múltiplas pelo Teste de Tukey para as médias das atividades sobre a caseína de solução a 1% de bromelina bruta segundo os efeitos de valor de pH e da temperatura.

nível	num.	média	intervalos para	
	obs.		grupos homogêneos	
		(ug/ml.min)	(índices)	
valor de pH				
3,0	15	283,16	*	a
8,5	15	285,85	*	a
4,0	15	318,27	*	b
7,0	15	322,17	**	b-c
4,8	15	345,90	**	c-d
6,5	15	351,71	*	d
temperatura (°C)				
60	18	206,72	*	a1
40	18	259,59	*	b1
70	18	290,76	*	c1
80	18	380,86	*	d1
50	18	451,28	*	e1

Tabela 5 : Atividades (ug/ml min) sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi Ananas comosus L. cv."pérola" em função da temperatura e do valor de pH para o projeto fatorial 6 x 5 com três repetições.

valor de pH	temperatura (°C)				
	40	50	60	70	80
3,0	74,01	120,70	25,74	100,96	105,80
3,0	88,53	125,54	28,97	120,33	103,38
3,0	77,07	144,91	33,65	71,90	105,80
4,0	70,78	164,28	103,06	280,13	105,06
4,0	86,11	154,59	99,83	299,50	95,37
4,0	94,99	154,59	103,06	289,82	105,06
4,8	77,24	164,28	106,29	294,66	385,93
4,8	80,46	154,59	96,61	289,82	405,30
4,8	78,85	159,44	109,52	299,50	424,67
6,5	91,76	144,91	64,32	275,29	424,67
6,5	100,64	169,12	70,78	299,50	400,46
6,5	92,57	157,02	62,71	275,29	376,25
7,0	104,68	159,44	96,61	270,45	230,97
7,0	70,78	142,49	99,83	280,13	260,02
7,0	93,38	159,44	99,83	275,29	269,71
8,5	63,51	115,85	80,46	212,34	222,02
8,5	72,39	149,75	88,53	202,65	139,70
8,5	77,24	132,80	90,15	192,97	146,96

Tabela 6 : Médias, erros padrão e intervalos de confiança para as atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. pérola em função do valor de pH e da temperatura.

nível	num. obs.	média (ug/ml.min)	erro padrão	intervalo de confiança (ug/ml.min)	
valor de pH		158,51			
3,0	15	88,49	9,43	81,21	95,76
4,0	15	147,08	20,27	139,81	154,35
4,8	15	208,48	33,07	201,21	215,75
6,5	15	200,35	33,51	193,08	207,62
7,0	15	174,20	20,82	166,93	181,48
8,5	15	132,49	14,09	125,22	139,76
temperatura		158,51			
40	18	83,06	2,70	76,42	89,69
50	18	148,54	3,68	141,90	155,18
60	18	81,11	6,48	74,47	87,74
70	18	240,59	17,41	233,95	247,22
80	18	239,29	30,97	232,65	245,92
valor de pH x temp.		158,51			
3,0	40	3	79,87	4,42	63,61
3,0	50	3	130,38	7,40	114,12
3,0	60	3	29,45	2,30	13,19
3,0	70	3	97,73	14,07	81,47
3,0	80	3	104,99	0,81	88,73
4,0	40	3	83,96	7,07	67,70
4,0	50	3	157,82	3,23	141,56
4,0	60	3	101,98	1,08	85,72
4,0	70	3	289,82	5,59	273,55
4,0	80	3	101,83	3,23	85,57
4,8	40	3	78,85	0,93	62,59
4,8	50	3	159,44	2,80	143,17
4,8	60	3	104,14	3,88	87,88
4,8	70	3	294,66	2,79	278,90
4,8	80	3	405,30	11,18	389,04
6,5	40	3	94,99	2,83	78,72
6,5	50	3	157,02	6,99	140,75
6,5	60	3	65,94	2,47	49,67
6,5	70	3	283,36	8,07	267,10
6,5	80	3	400,46	13,98	384,20
7,0	40	3	89,61	9,97	73,35
7,0	50	3	153,79	5,65	137,53
7,0	60	3	98,76	1,07	82,49
7,0	70	3	275,29	2,79	259,03
7,0	80	3	253,57	11,64	237,30
8,5	40	3	71,05	4,02	54,78
8,5	50	3	132,80	9,79	116,54
8,5	60	3	86,38	3,00	70,12
8,5	70	3	202,65	5,59	186,39
8,5	80	3	169,56	26,31	153,30
total	90	158,51	1,48	155,54	161,48

Tabela 7 : Efeitos do valor de pH e da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) na análise de variância para atividades (ug/ml.min) sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi Ananas comosus L. cv."pérola".

Fonte de variação	Soma dos quadrados	G. L.	Quadrado médio	F	Nível descritivo
Efeitos principais	603.879,60	9	67.097,73	338,56	0,00
valor de pH	153.073,92	5	30.614,78	154,48	0,00
temperatura	450.805,68	4	112.701,42	568,67	0,00
Interações	240.538,91	20	12.026,95	60,69	0,00
valor de pH x temperatura	240.538,91	20	12.026,95	60,69	0,00
Resíduo	11.891,02	60	198,18		
Total	856.309,52	89			

G.L. : graus de liberdade

Figura 4 : Médias e intervalos de confiança de 95 % para atividades sobre a caseína de solução a 1% de bromelina bruta segundo o efeito do valor de pH.

Figura 5 : Médias e intervalos de confiança de 95 % para atividades sobre a caseína de solução a 1% de bromelina bruta segundo o efeito da temperatura.

Figura 6 : Atividades médias sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. pérola em função do valor de pH e da temperatura.

Os valores de F da análise de variância foram de 154,48 e 568,67 para os efeitos de valor de pH e de temperatura respectivamente. Logo, os efeitos são significativos estatisticamente ($p = 0,00$) (Tabela 7).

A Tabela 8 mostra a análise de comparações múltiplas pelo método de Tukey das médias das atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. pérola segundo os efeito de valor de pH e da temperatura.

O máximo de atividade sobre a caseína foi observada a valor de pH 4,8 e 6,5, grupos considerados homogêneos estatisticamente. As atividades decrescem na seguinte ordem 7,0; 4,0; 8,5 e 3,0 sendo consideradas estatisticamente homogêneas a valores de pH 4,0 e 8,5 (Tabela 8, Figura 7).

Os resultados das médias das atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. pérola obtidas nas diferentes temperaturas atingem o máximo a 70 e 80 °C sendo considerados estatisticamente homogêneos (Tabela 8, Figura 8). As atividades decrescem na seguinte ordem 50, 40 e 60 sendo as duas últimas consideradas estatisticamente homogêneas.

As atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. havaí em função do valor de pH e da temperatura são apresentados na Tabela 9 e na Figura 9.

Tabela 8 : Análise de comparações múltiplas pelo Teste de Tukey para as médias das atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi cultivar pérola segundo os efeitos de valor de pH e da temperatura.

nível	num.	média	intervalos para	
	obs.	(ug/ml.min)	grupos homogêneos (índices)	
valor de pH				
3,0	15	88,49	*	a
8,5	15	132,49	*	b
4,0	15	147,08	*	b
7,0	15	174,20	*	c
6,5	15	200,35	*	d
4,8	15	208,48	*	d
temperatura (°C)				
60	18	81,11	*	a1
40	18	83,06	*	a1
50	18	148,54	*	b1
80	18	239,29	*	c1
70	18	240,59	*	c1

Tabela 9: Atividades (ug/ml min) sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi Ananas comosus L. cv."havaí" em função da temperatura e do valor de pH para o projeto fatorial 6 x 5 com três repetições.

valor de pH	temperatura (°C)				
	40	50	60	70	80
3,0	173,84	89,22	157,70	125,17	76,00
3,0	177,07	96,48	151,24	125,17	46,95
3,0	177,07	91,64	131,87	125,17	56,63
4,0	167,38	94,06	202,90	173,60	85,69
4,0	160,93	101,33	189,98	188,12	143,80
4,0	173,84	101,33	183,53	173,60	134,12
4,8	157,70	89,22	177,07	246,23	579,64
4,8	151,24	89,22	170,61	246,23	560,27
4,8	157,70	91,64	193,21	265,60	521,52
6,5	144,79	84,38	118,96	270,45	366,56
6,5	154,47	84,38	109,27	260,76	318,13
6,5	157,70	94,06	122,19	270,45	279,39
7,0	157,70	94,06	170,61	251,08	134,12
7,0	144,79	91,64	186,76	260,76	95,37
7,0	160,93	89,22	177,07	275,29	85,69
8,5	131,87	77,11	135,10	222,02	37,26
8,5	128,64	86,80	128,64	217,18	37,26
8,5	122,19	91,64	154,47	212,34	37,26

Figura 7 : Médias e intervalos de confiança de 95 % para atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. pérola segundo o efeito do valor de pH.

Figura 8 : Médias e intervalos de confiança de 95 % para atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. pérola segundo o efeito da temperatura.

Figura 9 : Atividades médias sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. havaí em função do valor de pH e da temperatura.

As médias, os erros padrão e os intervalos de confiança para a atividade sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. havaí em função do valor de pH e da temperatura podem ser vistos na Tabela 10.

Os resultados da análise de variância mostram o efeito de interação entre o valor de pH e a temperatura nas atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. havaí significativo estatisticamente ($p = 0,00$) (Tabela 11).

Os valores F obtidos na análise de variância para o efeito do valor de pH foram de 168,82 e, de 212,48 para a temperatura mostrando que existe efeito de valor de pH e de temperatura nas médias das atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi cv. havaí ($p = 0,00$) (Tabela 11).

A temperatura tem maior influência nas médias das atividades sobre a caseína que o valor de pH (Figuras 3, 6 e 9).

A Tabela 12 mostra a análise de comparações múltiplas pelo método de Tukey das médias das atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. havaí segundo os efeitos de valor de pH e da temperatura.

O máximo de atividade sobre a caseína foi observado a valor de pH 4,8. As atividades são consideradas estatisticamente homogêneas a valores de pH 4,0 e 7,0 e, 3,0 e 8,5. A ordem de atividades é a seguinte $4,8 > 6,5 > 7,0 = 4,0 > 8,5 = 3,0$ (Tabela 12, Figura 10).

Tabela 10 : Médias, erros padrão e intervalos de confiança para as atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. havaí em função do valor de pH e da temperatura.

nível	num. obs.	média (ug/ml.min)	erro padrão	intervalo de confiança (ug/ml.min)	
valor de pH		164,48			
3,0	15	120,08	11,05	112,74	127,42
4,0	15	151,61	10,08	144,27	158,96
4,8	15	246,47	43,49	239,13	253,84
6,5	15	189,06	24,45	181,72	196,40
7,0	15	158,34	16,54	151,00	165,68
8,5	15	121,32	16,09	113,98	128,66
temperatura		164,48			
40	18	155,55	3,82	148,84	162,25
50	18	90,97	1,38	84,27	97,67
60	18	158,95	6,77	152,25	165,65
70	18	217,18	12,54	210,48	223,88
80	18	199,76	44,76	193,06	206,46
valor de pH x temp.		164,48			
3,0	40	3	175,99	1,08	159,58 192,41
3,0	50	3	92,45	2,13	76,03 108,86
3,0	60	3	146,94	7,76	130,52 163,35
3,0	70	3	125,17	0,00	108,75 141,59
3,0	80	3	59,86	8,54	43,44 76,28
4,0	40	3	167,38	3,73	150,97 183,80
4,0	50	3	98,91	2,42	82,49 115,32
4,0	60	3	192,14	5,69	175,72 208,55
4,0	70	3	178,44	4,44	162,02 194,86
4,0	80	3	121,20	17,98	104,79 137,62
4,8	40	3	155,55	2,15	139,13 171,96
4,8	50	3	90,03	0,81	73,61 106,44
4,8	60	3	180,30	6,72	163,88 196,71
4,8	70	3	252,69	6,46	236,27 269,10
4,8	80	3	553,81	17,09	537,39 570,23
6,5	40	3	152,32	3,88	135,90 168,74
6,5	50	3	87,61	3,23	71,19 104,02
6,5	60	3	116,81	3,88	100,39 133,22
6,5	70	3	267,22	3,23	250,80 283,63
6,5	80	3	321,36	25,22	304,94 337,77
7,0	40	3	154,47	4,93	138,06 170,99
7,0	50	3	91,64	1,40	75,22 108,05
7,0	60	3	178,15	4,69	161,73 194,56
7,0	70	3	262,38	7,04	245,96 278,79
7,0	80	3	105,06	14,80	88,64 121,48
8,5	40	3	127,57	2,85	111,15 143,98
8,5	50	3	85,18	4,27	68,77 101,60
8,5	60	3	139,40	7,76	122,99 155,82
8,5	70	3	217,18	2,79	200,76 233,60
8,5	80	3	37,26	0,00	20,84 53,68
total	90		164,48	1,50	161,48 167,48

Tabela 11: Efeitos do valor de pH e da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) na análise de variância para atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi Ananas comosus L. cv."havaí".

Fonte de variação	Soma dos quadrados	G. L.	Quadrado médio	F	Nível descritivo
Efeitos principais	342.118,13	9	38.013,13	188,23	0,00
valor de pH	170.468,97	5	34.093,80	168,82	0,00
temperatura	171.649,16	4	42.912,29	212,48	0,00
Interações	497.695,46	20	24.884,77	123,22	0,00
valor de pH x temperatura	497.695,46	20	24.884,77	123,22	0,00
Resíduo	12.117,30	60	201,95		
Total	851.930,89	89			

G.L. : graus de liberdade

Tabela 12 : Análise de comparações múltiplas pelo Teste de Tukey para as médias das atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi cultivar havaí segundo os efeitos de valor de pH e temperatura.

nível	num.	média	intervalos para	
	obs.		grupos homogêneos	
		(ug/ml.min)	(índices)	
valor de pH				
3,0	15	120,08	*	a
8,5	15	121,32	*	a
4,0	15	151,61	*	b
7,0	15	158,34	*	b
6,5	15	189,06	*	c
4,8	15	246,47	*	d
temperatura (°C)				
50	18	90,97	*	a1
40	18	155,55	*	b1
60	18	158,95	*	b1
80	18	199,76	*	c1
70	18	217,18	*	d1

Figura 10 : Médias e intervalos de confiança de 95 % para atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. havaí segundo o efeito do valor de pH.

As médias das atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. havaí obtidas nas diferentes temperaturas atingem o máximo a 70 °C. As atividades decrescem na seguinte ordem 70 > 80 > 60 = 40 > 50 (Tabela 12, Figura 11).

O valor de pH de ótima digestão é influenciado pela natureza do substrato, pela concentração e pelo tipo de tampão e pela presença de agentes redutores (26, 46).

Os resultados de atividade no ponto de máximo mostraram (Tabelas 3, 6 e 9) que a bromelina bruta apresenta atividade aproximadamente duas vezes maior que a da enzima presente em ambos os sucos. Entretanto, considerando-se a quantidade de enzima bruta tem-se 10 g/l no primeiro caso e segundo a literatura (46) 500 mg/l de substância protéica no suco.

Comparando-se os valores máximos de atividade obtidos com suco de abacaxi variedades pérola e havaí (Tabelas 8 e 12) observa-se que os ótimos de ambos cultivares são os mesmos tanto para o valor de pH (4,8) quanto para a temperatura (70 °C).

Observa-se que o cultivar havaí mostrou maior atividade no ótimo de valor de pH enquanto o pérola apresentou na temperatura de 70 °C.

As análises de variância para as atividades enzimáticas mostraram evidências da significância dos efeitos e da interação entre eles.

Isso indica a possibilidade de se propor um projeto fatorial com ponto central.

Figura 11 : Médias e intervalos de confiança de 95 % para atividades sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi var. hawai segundo o efeito da temperatura.

Os efeitos da temperatura e do tipo de enzima na concentração final de sólidos solúveis da carne após hidrólise durante 30 minutos pode ser vista na Tabela 16.

A Tabela 17 mostra as médias, os erros padrão e os intervalos de confiança para a concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina segundo os efeitos do tipo de enzima (bruta, pérola e havaí), da temperatura (40, 50 e 60 °C) e de suas interações.

A Figura 12 apresenta a concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina segundo os efeitos do tipo de enzima (bruta, pérola e havaí) e da temperatura (40, 50 e 60 °C).

Os resultados da análise de variância mostram o efeito de interação entre o tipo de enzima e a temperatura não significativo estatisticamente ($p = 0,72$) (Tabela 18).

A Figura 13 apresenta o efeito da temperatura na média da concentração de sólidos solúveis da proteína da carne bovina tratada com bromelina por 30 minutos. Observa-se um aumento de 27 % na solubilidade da proteína com o aumento da temperatura de 40 para 60 °C.

O valor F obtido na análise de variância para o efeito da temperatura foi de 7,9 mostrando o efeito de temperatura na média da concentração de sólidos solúveis significativo estatisticamente ($p = 0,01$) (Tabela 18).

5.2 - Hidrólise

As Tabelas 13, 14 e 15 mostram os valores da solubilidade alcançados pelas proteínas da carne bovina submetidas à hidrólise com solução a 1 % da enzima bruta e, com bromelina de suco de abacaxi cultivares pérola e havaí.

Observa-se um aumento da solubilidade das proteína evidenciado pelo incremento da concentração de sólidos solúveis. PETERSEN (93) descreve o aumento da solubilidade das proteínas quando submetidas à hidrólise enzimática.

Calculando-se o percentual de sólidos solúveis em relação à massa inicial de sólidos na suspensão, observa-se que a percentagem de solubilização média após hidrólise com a solução de enzima foi de 63 % (Tabela 13); com a bromelina de suco de abacaxi cultivar pérola de 47 % (Tabela 14), de havaí de 41 % (Tabela 15). O valor de pH é praticamente estável durante todo o tratamento.

Em apenas 30 minutos de hidrólise, os valores da diferença entre os sólidos solúveis final e inicial é igual ou superior, conforme o caso, aos valores obtidos por ASAKURA (4) utilizando a bromelina comercial num tempo de hidrólise três vezes maior. Dados semelhantes foram obtidos por BARUFFALDI et col. (9, 10).

Tabela 13 : Concentração de sólidos solúveis (g/100g) e valor de pH de amostras de carne bovina hidrolisadas com solução a 1 % bromelina bruta em diferentes temperaturas.

		temperatura (°C)					
		40		50		60	
		am 1	am 2	am 1	am 2	am 1	am 2
valor de pH	inicial	5,5	5,6	5,4	4,7	5,4	5,6
	final	5,7	5,5	5,5	4,7	5,6	5,5
brix	inicial	3,2	3,0	4,0	4,0	3,9	3,6
	final	11,0	10,4	13,0	12,2	12,5	13,0
css	inicial	4,3	4,1	5,1	5,1	5,0	4,7
	final	11,9	11,3	13,8	13,0	13,3	13,8
	diferença	7,5	7,2	8,7	7,9	8,3	9,1
temp.		76	78	76	81	81	76
final							
(°C)							

css : concentração de sólidos solúveis

am : amostra

Tabela 14 : Concentração de sólidos solúveis (g/100g) e valor de pH de amostras de carne bovina hidrolisadas com bromelina de suco de abacaxi Ananas comosus L. cv."pérola" em diferentes temperaturas.

		temperatura (°C)					
		40		50		60	
		am 1	am 2	am 1	am 2	am 1	am 2
valor de pH	inicial	4,8	4,5	4,6	4,7	4,3	4,3
	final	4,8	4,7	4,6	4,7	4,8	4,9
brix	inicial	7,8	8,0	9,2	7,0	9,0	9,0
	final	15,7	14,0	17,8	16,9	19,6	17,2
css	inicial	8,8	9,0	10,1	8,0	9,9	9,9
	final	16,4	14,8	18,4	17,6	20,2	17,9
	diferença	7,6	5,8	8,3	9,6	10,2	7,9
temp.		78	75	76	80	74	75
final							
(°C)							

css : concentração de sólidos solúveis

am : amostra

Tabela 15 : Concentração de sólidos solúveis (g/100g) e valor de pH de amostras de carne bovina hidrolisadas com bromelina de suco de abacaxi Ananas comosus L. cv."havaí" em diferentes temperaturas.

		temperatura (°C)					
		40		50		60	
		am 1	am 2	am 1	am 2	am 1	am 2
valor de pH	inicial	4,7	4,3	4,8	4,3	4,5	4,6
	final	4,7	4,6	4,8	4,8	4,9	4,7
brix	inicial	7,6	10,0	9,1	9,1	7,1	7,1
	final	13,6	14,2	15,6	16,0	15,2	15,0
css	inicial	8,6	10,9	10,0	10,0	8,1	8,1
	final	14,4	15,0	16,3	16,7	15,9	15,7
	diferença	5,8	4,1	6,3	6,7	7,8	7,6
temp.		74	76	76	80	75	76
final							
(°C)							

css : concentração de sólidos solúveis

am : amostra

Tabela 16: Concentração de sólidos solúveis (g/100g) de hidrolisados de carne em função da temperatura e do tipo de enzima para o projeto fatorial 3 x 3 com duas repetições.

temperatura (°C)	tipo de enzima		
	bruta	pérولا	havaí
40	7,5	7,6	5,8
	7,2	5,8	4,1
50	8,7	8,3	6,3
	7,9	9,6	6,7
60	8,3	10,2	7,8
	9,1	7,9	7,6

Tabela 17 : Médias, erros padrão e intervalos de confiança para concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina segundo os efeitos de tipo de enzima (bruta, pérola e havaí) e da temperatura (40, 50 e 60 °C).

nível	número	média	erro	erro	intervalo de	
	observações		padrão	padrão	confiança	
		(g/100g)			(g/100g)	
temperatura		7,58				
40	6	6,33	0,56	0,37	5,49	7,16
50	6	7,92	0,51	0,37	7,08	8,75
60	6	8,48	0,41	0,37	7,65	9,32
tipo de enzima		7,58				
bruta	6	8,12	0,29	0,37	7,28	8,95
pérola	6	8,23	0,64	0,37	7,39	9,07
havaí	6	6,38	0,55	0,37	5,55	7,22
temperatura x tipo de enzima		7,58				
40	bruta 2	7,35	0,15	0,64	5,90	8,79
40	pérola 2	8,30	0,40	0,64	6,86	9,74
40	havaí 2	8,70	0,40	0,64	7,25	10,14
50	bruta 2	6,70	0,90	0,64	5,25	8,14
50	pérola 2	8,95	0,65	0,64	7,51	10,39
50	havaí 2	9,05	1,15	0,64	7,60	10,49
60	bruta 2	4,95	0,85	0,64	3,50	6,39
60	pérola 2	6,50	0,20	0,64	5,05	7,94
60	havaí 2	7,70	0,10	0,64	6,25	9,14
total	18	7,58	0,21	0,21	6,95	8,21

Figura 12 : Ação de bromelina sobre a carne bovina segundo os efeitos de tipo de enzima (bruta, pérola e havaí) e da temperatura (40, 50 e 60 °C) após tratamento por 30 minutos.

Figura 13 : Efeito da temperatura de hidrólise nas médias da concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina após tratamento com bromelina por 30 minutos.

A Figura 14 apresenta o efeito do tipo de enzima (bruta, pérola e havaí) na média da concentração de sólidos solúveis alcançados pela proteína da carne bovina após 30 minutos de hidrólise. Observa-se que a maior solubilidade foi obtida com a bromelina bruta e com a do cultivar pérola. A enzima presente no suco de abacaxi cultivar havaí acarretou em menor teor de sólidos solúveis.

O valor F obtido na análise de variância para o efeito do tipo de enzima foi de 9,14 mostrando o efeito de tipo de enzima na média da concentração de sólidos solúveis significativo estatisticamente ($p = 0,01$) (Tabela 18).

Considerando-se a quantidade de enzima bruta como maior em relação à presente no suco de abacaxi, observa-se que o valores em sólidos solúveis referentes à enzima "in natura" são superiores àqueles obtidos com a isolada e purificada (Figura 12).

Com a bromelina presente no suco de abacaxi cultivar pérola, observa-se uma maior solubilidade da proteína da carne bovina após hidrólise durante 30 minutos.

A bromelina existente no suco "in natura" apresenta atividade proteolítica alta resultando em valores de concentração de sólidos solúveis superiores aos alcançados pela enzima isolada e purificada.

A Tabela 19 mostra a análise de comparações múltiplas pelo método de Tukey das médias da concentração de sólidos solúveis segundo os efeitos de tipo de enzima e da temperatura.

Tabela 18 : Análise de variância para concentração de sólidos solúveis (g/100g) de hidrolisados de carne bovina segundo os efeitos de tipo de enzima (bruta, pérula e havaí) e da temperatura (40, 50 e 60 °C).

Fonte de variação	Soma dos quadrados	G. L.	Quadrado médio	F	Nível descritivo
Efeitos principais	27,78	4	6,95	8,52	0,00
temperatura	12,88	2	6,44	7,90	0,01
tipo de enzima	14,90	2	7,45	9,14	0,01
Interações	1,69	4	0,42	0,52	0,72
temperatura x tipo de enzima	1,69	4	0,42	0,52	0,72
Resíduo	7,34	9	0,82		
Total	36,81	17			

G.L. : graus de liberdade

Tabela 19 : Análise de comparações múltiplas pelo Teste de Tukey para as médias das concentrações de sólidos solúveis (g/100g) segundo os efeitos de tipo de enzima (bruta, pérola, havaí) e da temperatura (40, 50 e 60 °C).

nível	num.	média	intervalos para	
	obs.		grupos homogêneos	
		(g/100g)	(índices)	
tipo de enzima				
havaí	6	6,4	*	a
bruta	6	8,1	*	a
pérola	6	8,2	*	a
temperatura (°C)				
40	6	6,3	*	al
50	6	7,9	*	al
60	6	8,5	*	al

Figura 14 : Efeito do tipo de enzima (bruta, pérola e havaí) nas médias da concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina após tratamento com bromelina por 30 minutos.

Os resultados revelam a homogeneidade entre as médias da concentração de sólidos solúveis obtidas pela hidrólise da proteína da carne bovina pela bromelina. Isto é, os efeitos de tipo de enzima e da temperatura estudados simultaneamente não afetam a solubilidade atingida pelas proteínas no tempo de hidrólise determinado.

5.3 - Parâmetros de resistência térmica de Bacillus stearothermophilus

Nos ensaios preliminares após 48 horas a contagem de microrganismos inoculados em hidrolisados de carne bovina permaneceu a mesma a valor de pH 5,6, aumentou a valor de pH 7,0 e diminuiu a valor de pH 4,5.

Com referência ao valor de pH , naquele iniciado a valor igual a 7,0 houve uma queda para 6,6.

Os resultados obtidos de resistência térmica dos esporos de Bacillus stearothermophilus em hidrolisados de carne bovina, pelo do método do tubo capilar são apresentados nas Tabelas 20, 21, 22, 23 e 24.

As Figuras 15 a 24 apresentam as curvas de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 109, 112, 115, 118 e 121 °C. Foram estudados os efeitos dos valores de pH 5,6 e 6,6 nos resultados dos tempos de redução decimal, D.

Amostras de hidrolisados de carne a valor de pH 4,5 inoculadas com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 e submetidas a tratamento térmico não apresentaram sobreviventes mesmo com 30 segundos de aquecimento.

Tabela 20: Dados de resistência térmica de esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 hidrolisado de carne bovina valores de pH 5,6 e 6,6 e, na temperatura de 109 °C empregando-se o método dos tubos capilares.

pH = 5,6			pH = 6,6		
tempo	n.sobrev.	log	tempo	n.sobrev.	log
		n.sobrev.			n.sobrev.
(min)	(UFC/ml)	(UFC/ml)	(min)	(UFC/ml)	(UFC/ml)
0	$2,2 \times 10^6$	6,35	0	$1,6 \times 10^6$	6,20
18	$1,2 \times 10^6$	6,08	18	$1,2 \times 10^6$	6,06
32	$7,2 \times 10^5$	5,86	48	$1,0 \times 10^6$	6,00
64	$4,0 \times 10^4$	4,60	72	$4,0 \times 10^5$	5,60
78	$1,2 \times 10^4$	4,08	84	$3,2 \times 10^5$	5,50
108	$8,0 \times 10^2$	2,90	120	$6,4 \times 10^4$	4,81

Tabela 21: Dados de resistência térmica de esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina valores de pH 5,6 e 6,6 e, na temperatura de 112 °C empregando-se o método dos tubos capilares.

pH = 5,6			pH = 6,6		
tempo	n.sobrev.	log	tempo	n.sobrev.	log
		n.sobrev.			n.sobrev.
(min)	(UFC/ml)	(UFC/ml)	(min)	(UFC/ml)	(UFC/ml)
0	$2,1 \times 10^6$	6,32	0	$1,6 \times 10^6$	6,20
6	$1,2 \times 10^6$	6,08	9	$1,7 \times 10^6$	6,22
18	$4,0 \times 10^5$	5,60	18	$6,4 \times 10^5$	5,81
24	$1,6 \times 10^5$	5,20	24	$3,6 \times 10^5$	5,56
32	$8,0 \times 10^4$	4,90	48	$2,4 \times 10^5$	5,38
64	$8,0 \times 10^3$	3,90	72	$5,2 \times 10^4$	4,72

Tabela 22: Dados de resistência térmica de esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina valores de pH 5,6 e 6,6 e, na temperatura de 115 °C empregando-se o método dos tubos capilares.

pH = 5,6			pH = 6,6		
tempo	n.sobrev.	log	tempo	n.sobrev.	log
		n.sobrev.			n.sobrev.
(min)	(UFC/ml)	(UFC/ml)	(min)	(UFC/ml)	(UFC/ml)
0	$1,2 \times 10^6$	6,09	0	$1,0 \times 10^6$	6,02
1	$2,4 \times 10^5$	5,39	3	$8,8 \times 10^4$	4,94
2	$9,2 \times 10^4$	4,96	6	$2,4 \times 10^4$	4,38
3	$2,8 \times 10^4$	4,45	9	$3,2 \times 10^3$	3,51
4	$8,0 \times 10^3$	3,90	12	$8,0 \times 10^2$	2,90
5	$3,6 \times 10^3$	3,56	18	$4,0 \times 10^2$	2,60
6	$2,0 \times 10^3$	3,30			

Tabela 23: Dados de resistência térmica de esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina valores de pH 5,6 e 6,6 e, na temperatura de 118 °C empregando-se o método dos tubos capilares,

pH = 5,6			pH = 6,6		
tempo	n.sobrev.	log	tempo	n.sobrev.	log
		n.sobrev.			n.sobrev.
(min)	(UFC/ml)	(UFC/ml)	(min)	(UFC/ml)	(UFC/ml)
0	$1,1 \times 10^6$	6,04	0	$1,6 \times 10^6$	6,20
2	$2,0 \times 10^4$	4,30	3	$4,8 \times 10^4$	4,68
4	$1,2 \times 10^3$	3,08	6	$8,4 \times 10^3$	3,92
6	0,0		12	$4,0 \times 10^2$	2,60
			18	0,0	

Tabela 24: Dados de resistência térmica de esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina valores de pH 5,6 e 6,6 e, na temperatura de 121 °C empregando-se o método dos tubos capilares.

pH = 5,6			pH = 6,6		
tempo	n.sobrev.	log	tempo	n.sobrev.	log
		n.sobrev.			n.sobrev.
(min)	(UFC/ml)	(UFC/ml)	(min)	(UFC/ml)	(UFC/ml)
0,0	$1,2 \times 10^6$	6,09	0,0	$1,0 \times 10^6$	6,02
0,5	$4,1 \times 10^5$	5,61	1,5	$1,4 \times 10^4$	4,15
1,0	$4,4 \times 10^4$	4,64	3,0	$8,0 \times 10^2$	2,90
1,5	$3,2 \times 10^3$	3,51	4,5	0,0	
2,0	0,0

Figura 15 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 5,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 109 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 16 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 6,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 109 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 17 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 5,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 112 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 18 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 6,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 112 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 19 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 5,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 115 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 20 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 6,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 115 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 21 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 5,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 118 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 22 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 6,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 118 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 23 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 5,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 121 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 24 : Curva de regressão de dados experimentais obtidos com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 6,6, mostrando a relação entre o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento das amostras a 121 °C. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

As Tabelas 25 e 26 apresentam as equações de regressão, coeficientes de correlação (r), coeficientes de determinação (r^2), D (tempo de redução decimal), $\log D$, K (constante de velocidade de destruição térmica) de esporos de Bacillus stearothermophilus em hidrolisados de carne bovina calculados a partir dos dados das Tabelas 20 a 24.

Os dois métodos tradicionais de expressar a dependência da temperatura na taxa de morte de microrganismos usam duas funções matemáticas distintas : as curvas de destruição térmica e o método de Arrhenius.

A resistência térmica do microrganismo a diferentes temperaturas consideradas letais são expressas pelas curvas de destruição térmica (TD) ou curvas de tempo de destruição térmica (TDT). Estas relacionam o log do tempo de redução decimal com a temperatura de tratamento. A curva TDT pode ser matematicamente expressa pela seguinte equação (22, 98):

$$\log D_T = \log D_{T_{ref}} + (T_{ref} - T) / Z$$

onde : D = tempo de redução decimal (min)

T_{ref} = temperatura de referência ($^{\circ}\text{C}$)

Z = intervalo de temperatura necessário para
a curva TDT atravessar um ciclo log ($^{\circ}\text{C}$)

As Figuras 25 e 26 mostram as curvas de destruição térmica de esporos de Bacillus stearothermophilus em hidrolisados de carne bovina a valores de pH 5,6 e 6,6.

Tabela 25: Equações de regressão, coeficientes de correlação (r), coeficientes de determinação (r^2), D (tempo de redução decimal), log D, K (constante de velocidade de destruição térmica) de esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisados de carne bovina a valor de pH = 5,6.

temp. (°C)	F(x)	r	r^2 (%)	D (min)	log D (min)	K (min ⁻¹)	p
109	6,63 - 0,03 x	0,99	97,87	30,03	1,48	0,08	0,00
112	6,25 - 0,04 x	0,993	98,65	26,18	1,42	0,09	0,00
115	5,92 - 0,48 x	0,992	98,47	2,14	0,33	1,08	0,00
118	5,95 - 0,74 x	0,995	98,98	1,35	0,13	1,71	0,06
121	6,27 - 1,74 x	0,99	97,16	0,57	-0,24	4,04	0,01

Tabela 26: Equações de regressão, coeficientes de correlação (r), coeficientes de determinação (r^2), D (tempo de redução decimal), $\log D$, K (constante de velocidade de destruição térmica) de esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisados de carne bovina a valor de pH = 6,6.

temp. (°C)	F(x)	r	r^2 r (%)	D (min)	log D (min)	K (min ⁻¹)	p
109	6,33 - 0,01 x	0,95	90,85	90,09	1,95	0,02	0,00
112	6,23 - 0,02 x	0,97	94,53	48,54	1,69	0,05	0,00
115	5,60 - 0,19 x	0,96	91,96	5,18	0,71	0,44	0,00
118	5,86 - 0,29 x	0,98	95,59	3,49	0,54	0,66	0,02
121	5,92 - 1,04 x	0,993	98,70	0,96	-0,017	2,4	0,07

Figura 25 : Curva de destruição térmica de esporos Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 5,6. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 26 : Curva de destruição térmica de esporos Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de pH = 6,6. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

A regressão linear dos dados do log D em função da temperatura define as seguintes equações:

$$\log D = 18,76 - 0,16 T \quad r = 0,96 \quad (\text{pH } 5,6) \quad (p = 0,01)$$

$$\log D = 20,49 - 0,17 T \quad r = 0,98 \quad (\text{pH } 6,6) \quad (p = 0,003)$$

O valor Z (inverso negativo do coeficiente angular) foi de 6,3 °C (pH 5,6) e 5,9 °C (pH 6,6).

Os resultados dos parâmetros D e Z no presente estudo são comparados com outros na Tabela 27. Enquanto existem diferenças na resistência térmica ($D_{121}^{\circ\text{C}}$) ocasionada por diferentes cepas, métodos de esporulação, veículos ou substratos de aquecimento e meios de cultura para a recuperação de esporos estressados, os valores de D e Z a temperaturas menores ou mais baixas são comparáveis aos obtidos por outros pesquisadores (90, 92).

Os dados de resistência térmica de esporos de Bacillus stearothermophilus em hidrolisado de carne bovina foram também tratados de acordo com a relação de Arrhenius (22, 62, 70, 98, 118, 119) :

$$K = A (-E_a/RT)$$

onde: K = constante de velocidade de destruição microbiana pelo calor ou $2,303/D$ (s^{-1})

A = coeficiente de frequência de Arrhenius (s^{-1})

E_a = energia de ativação (cal/mol)

R = constante dos gases (1,987 cal/mol.K)

T = temperatura absoluta (°K)

Tabela 27: Alguns valores publicados dos parâmetros D (tempo de redução decimal), Z (resistência do microrganismo a diferentes temperaturas) e Ea (energia de ativação) para esporos de Bacillus stearothermophilus.

cepa	substrato	D 121°C (min)	Z (°C)	faixa temp. aquec. (°C)	Ea (kcal/ mol)	Ref.
FS 7954	tampão fosfato pH 7,0	0,1	8,3	127-144	92	WANG, 1964 (131)
NCIB 8919	água	3,1	7,0	115-121	100	BRIGGS, 1966 (19)
PCIF	água	3,3		121		PFLUG, 1976 (94)
	tampão de Sorensen M/15 pH 7,0	3,1		121		
ATCC 7953	tampão fosfato pH 7,0	2,1	8,5	111-125	82	JONSSON, 1977 (48)
TH 24 NCDD1096	água	12,2	7,3	120-132,5	100	DAVIES, 1977 (23)
FS 1518	tampão fosfato pH 7,0	3,6	15,2	121-132	89,9	BARUF., 1982 (12)
TH 24 NCDD1096	água	8,7	9,3	115-145	80	DAVID, 1990 (22)
FS 1518	hidrolisado carne bovina					
	pH = 5,6	0,57	6,3	109-121	170,4	presente estudo
	pH = 6,6	0,96	5,9	109-121	183,6	Tabelas 25 e 26

A dependência da temperatura na constante de velocidade de destruição pelo calor de esporos de Bacillus stearothermophilus definida pela relação de Arrhenius é apresentada nas Figuras 27 e 28.

A regressão linear dos dados de K (constante de velocidade de destruição térmica pelo calor) e o inverso da temperatura absoluta definem as seguintes equações:

$$K = 175,2 \quad (-85778,4/T) \quad r = 0,96 \quad (\text{pH } 5,6)$$

2

$$(r = 91,79 \%, \quad p = 0,01)$$

$$K = 187,9 \quad (-92385,1/T) \quad r = 0,98 \quad (\text{pH } 6,6)$$

2

$$(r = 95,94 \%, \quad p = 0,00)$$

O coeficiente angular da equação de regressão linear fornece a $E_a = 170,44 \text{ kcal/mol}$ (pH 5,6) e $E_a = 183,57 \text{ kcal/mol}$ (pH 6,6); o intercepto $A = 175,2 \text{ s}^{-1}$ (pH 5,6) e $A = 187,92 \text{ s}^{-1}$ (pH 6,6). Os valores de E_a de outros pesquisadores (Tabela 27) foram calculados a partir da seguinte equação:

$$E_a = 2,303 R T_1 T_2 / Z$$

onde: T_1 e T_2 são as temperaturas mínimas e máximas de aquecimento (K) respectivamente.

Figura 27 : Influência da temperatura na velocidade de destruição térmica pela relação de Arrhenius de esporos Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de $\text{pH} = 5,6$. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

Figura 28: Influência da temperatura na velocidade de destruição térmica pela relação de Arrhenius de esporos Bacillus stearothermophilus FS 1518 em hidrolisado de carne bovina a valor de $\text{pH} = 6,6$. As linhas pontilhadas externas indicam um intervalo de confiança de 95 % e as internas de 99 % para a regressão.

5.4 - Condições ótimas de operação

As técnicas de superfície de resposta são usadas para determinar como uma resposta é afetada por dadas variáveis numa região específica de interesse, quais determinações darão um produto com especificações desejáveis; quais valores acarretarão num máximo de uma resposta específica e, qual a superfície de resposta mais próxima ao máximo.

O ponto de partida do estudo é dado pelas melhores condições, dentre as pré-estabelecidas, de temperatura (40, 50, 60, 70 e 80 °C) e de valor de pH (3,0, 4,0, 4,8, 6,5, 7,0 e 8,5).

Neste estudo as variáveis respostas atividade enzimática de bromelina de suco de abacaxi e o incremento na concentração de sólidos solúveis do hidrolisado de carne são etapas de importância e foram medidas em cada experimento.

5.4.1 - Condições ótimas de operação para atividade enzimática

Os resultados de atividade enzimática de bromelina de suco de abacaxi sobre a caseína na primeira região de estudo (Experimentos 1 a 7) são mostrados na Tabela 28.

A Tabela 29 mostra os parâmetros do modelo de primeira ordem obtido a partir dos resultados da Tabela 28 para estimar a atividade enzimática de bromelina de suco de abacaxi a partir de dados de temperatura e de valor de pH.

Tabela 28: Resultados do modelo fatorial de primeira ordem para atividade enzimática (A.E.) de bromelina de suco de abacaxi com três pontos centrais.

exp.	variáveis nas unidades originais		variáveis nas unidades codificadas		*	**
	temp. (°C)	valor de pH	x1	x2	A.E. (ug/ml.min)	A.E. (ug/ml.min)
1	40	3,00	-1,00	-1,00	79,87	79,56
2	80	3,00	+1,00	-1,00	104,99	69,12
3	40	8,50	-1,00	+1,00	71,05	79,36
4	80	8,50	+1,00	+1,00	169,56	142,32
5	60	5,75	0,00	0,00	171,69	171,63
6	60	5,75	0,00	0,00	174,43	171,63
7	60	5,75	0,00	0,00	168,95	171,63

* dados experimentais

** dados estimados pelo modelo de segunda ordem

Tabela 29: Modelos de regressão linear múltipla de primeira ordem para estimar a atividade enzimática (A.E) de bromelina de suco de abacaxi a partir de dados de temperatura e valor de pH.

variável independente	coeficiente regressão	erro padrão	t-Student	nível descritivo	R ²	F
constante	134,51	18,77	7,2	0,01	0,45	0,80
x1	30,91	24,83	1,25	0,30		
x2	13,94	24,83	0,56	0,61		
x1.x2	18,35	24,83	0,74	0,51		

* p = 0,57

A estimação a partir do projeto de primeira ordem para temperatura, valor de pH e atividade enzimática de suco de abacaxi define a equação:

$$\hat{y} = 134,36 + 30,91 x_1 + 13,94 x_2 + 18,35 x_1 . x_2$$

onde : $\hat{y}$ = atividade enzimática (ug/ml.min)

x_1 = temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

x_2 = valor de pH

O teste do ajuste do modelo mostra que o erro padrão estimado foi de 2,74. Ao verificar-se a interação, obteve-se $b_{12} = 18,35 \pm 2,74$. O coeficiente é significativo pois seu valor é maior que o erro padrão.

O valor da curvatura $b_{11} + b_{22}$ foi de $-65,32 \pm 2,74$. Isto indica que o valor da curvatura é muito maior do que o erro padrão. A existência de termos quadráticos é significativa.

Os resultados da análise de variância para o modelo mostram que a regressão obtida não é significativa estatisticamente ($R^2 = 0,35$, $p = 0,43$) (Tabela 29). Isto significa que a aproximação polinomial pelo projeto de primeira ordem mostrou-se pouco adequada na região experimentada.

A Figura 29 mostra a representação tridimensional da superfície de resposta do projeto de primeira ordem.

Figura 29: Representação tridimensional da superfície de resposta do modelo de primeira ordem da relação entre a temperatura, o valor de pH e a atividade enzimática de bromelina de suco de abacaxi.

Figura 30: Contornos da equação de primeira ordem obtida da relação entre a temperatura, o valor de pH e a atividade enzimática de bromelina de suco de abacaxi.

Os contornos da equação ajustada são mostrados na Figura 30. Observa-se que o aumento no valor de pH e na temperatura acarretam em maior atividade da bromelina.

Os resultados de atividade enzimática de bromelina de suco de abacaxi sobre a caseína em toda a região de estudo (Experimentos 1 a 14) são mostrados nas Tabelas 28 e 30.

A Tabela 31 mostra a composição para um projeto de segunda ordem proposto para estimar a atividade enzimática de bromelina de suco de abacaxi a partir de dados de temperatura e de valor de pH.

A equação de segundo grau ajustada por regressão múltipla dos 14 resultados do modelo composto (Tabelas 28 e 30) é:

$$\hat{y} = 171,63 + 13,13 x_1 + 18,25 x_2 + 18,35 x_1 \cdot x_2 - 25,59 x_1^2 - 53,45 x_2^2$$

(Equação 1)

onde : $\hat{y}$ = atividade enzimática (ug/ml.min)

x_1 = temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

x_2 = valor de pH

O significado estatístico dos termos quadráticos pode ser interpretado como respostas curvilíneas de atividade enzimática inicialmente pequena, aumentando com o aumento da temperatura, atingindo um máximo e depois caindo.

Tabela 30: Resultados do modelo fatorial composto de segunda ordem para atividade enzimática (A.E.) de bromelina de suco de abacaxi.

exp.	variáveis nas unidades originais		variáveis nas unidades codificadas		*	**
	temp. (°C)	valor de pH	x1	x2	A.E. (ug/ml.min)	A.E. (ug/ml.min)
8	32	5,75	-1,41	0,00	113,58	102,24
9	88	5,75	+1,41	0,00	100,20	139,27
10	60	1,86	0,00	-1,41	19,66	39,63
11	60	9,64	0,00	+1,41	83,34	91,1
12	60	5,75	0,00	0,00	171,69	171,63
13	60	5,75	0,00	0,00	171,69	171,63
14	60	5,75	0,00	0,00	171,69	171,63

* dados experimentais

** dados estimados pelo modelo de segunda ordem

Tabela 31: Modelos de regressão linear múltipla de segunda ordem para estimar a atividade enzimática (A.E.) de bromelina suco de abacaxi a partir de dados de temperatura e de valor de pH.

variável independente	coeficiente regressão	erro padrão	t-Student	nível descritivo	R ²	F
constante	171,63	9,38	18,29	0,00	0,88	11,26
x1	13,13	8,14	1,61	0,14		
x2	18,25	8,14	2,25	0,05		
x1.x2	18,35	11,49	1,6	0,15		
x1 ²	-25,59	8,49	-3,01	0,02		
x2 ²	-53,45	8,49	6,20	0,00		

* p = 0,002

Os parâmetros do ajuste do modelo de segundo grau obtidos são significativos estatisticamente ($R^2 = 0,88$, $p = 0,00$) (Tabela 31).

A Figura 31 apresenta a representação tridimensional da superfície de resposta do modelo de segunda ordem da relação entre a temperatura, o valor de pH e a atividade enzimática sobre a caseína de bromelina de suco de abacaxi.

Os contornos da equação ajustada são mostrados na Figura 32. Observam-se linhas de contorno de atividade enzimática caminhando para uma região de máximo.

O valor de pH tem maior influência na atividade que a temperatura. Isto é, para um mesmo aumento de valor de pH e de temperatura nas variáveis codificadas, a atividade enzimática cresce mais rapidamente na direção do aumento do valor de pH.

A equação do modelo da atividade enzimática da bromelina de suco de abacaxi na forma canônica é:

$$\hat{Y} - 175,94 = -22,85 X_1^2 - 56,2 X_2^2$$

$$\text{onde : } Y_s = 175,94 \text{ ug/ml.min}$$

$$\lambda_{11} = -22,85$$

$$\lambda_{22} = -56,2$$

X_1 e X_2 = novas coordenadas na forma canônica

Figura 31: Representação tridimensional da superfície de resposta do modelo de segunda ordem da relação entre a temperatura, o valor de pH e a atividade enzimática de bromelina de suco de abacaxi.

Figura 32: Contornos da equação de segunda ordem obtida da relação entre a temperatura, o valor de pH e a atividade enzimática de bromelina de suco de abacaxi.

O movimento em qualquer direção de S resulta em perda de atividade enzimática. Portanto, a superfície ajustada apresenta um máximo em S, isto é, nas coordenadas $X_{1s} = 0,34$ ($66,8^{\circ}\text{C}$) e $X_{2s} = 0,23$ (valor de $\text{pH} = 6,4$).

Os sinais dos dois coeficientes negativos indicam um ponto estacionário de máximo. O ponto estacionário encontra-se dentro da região experimental e a superfície de resposta é alongada na direção de X_1 , isto é no sentido da temperatura. A superfície é do tipo paraboloide elíptica.

5.4.2 - Condições ótimas de operação para a concentração de sólidos solúveis

Os resultados da concentração de sólidos solúveis da carne bovina hidrolisada com bromelina de suco de abacaxi na primeira região estudada (Experimentos 1 a 7) podem ser vistos na Tabela 32.

A Tabela 33 mostra o projeto de primeira ordem proposto para estimar a concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina a partir de dados de temperatura e de valor de pH .

Tabela 32: Resultados do modelo fatorial de primeira ordem para concentração de sólidos solúveis (C.S.S.) de hidrolisados de carne bovina com três pontos centrais.

exp.	variáveis nas unidades originais		variáveis nas unidades codificadas		*	**
	temp. (°C)	valor de pH	x1	x2	C.S.S. (g/100g)	C.S.S. (g/100g)
1	40	3,00	-1,00	-1,00	3,9	4,3
2	80	3,00	+1,00	-1,00	5,1	6,4
3	40	8,50	-1,00	+1,00	4,4	5,7
4	80	8,50	+1,00	+1,00	7,4	7,8
5	60	5,75	0,00	0,00	7,2	6,1
6	60	5,75	0,00	0,00	6,8	6,1
7	60	5,75	0,00	0,00	7,2	6,1

* dados experimentais

** dados estimados pelo modelo de segunda ordem

Tabela 33: Modelo de regressão linear múltipla de primeira ordem para estimar a concentração de sólidos solúveis (C.S.S.) (g/100g) a partir de dados de temperatura e de valor de pH.

variável independente	coeficiente regressão	erro padrão	t-Student	nível descritivo	R ²	F
constante	6,06	0,54	11,15	0,002	0,54	1,18
x1	1,05	0,71	1,48	0,24		
x2	0,7	0,71	0,98	0,4		
x1.x2	0,45	0,71	0,63	0,57		

* p = 0,4473

A estimação a partir do projeto de primeira ordem para temperatura, valor de pH e a concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina definem a equação:

$$\hat{y} = 6,06 + 1,05 x_1 + 0,7 x_2 + 0,45 x_1.x_2$$

onde : $\hat{y}$ = concentração de sólidos solúveis (g/100g)

x_1 = temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

x_2 = valor de pH

O teste do ajuste do modelo mostra que o erro padrão estimado foi de 0,23. Ao verificar-se a interação, obteve-se $b_{12} = 0,45 \pm 0,23$. O coeficiente é significativo pois seu valor é maior do que o erro padrão.

O valor da curvatura $b_{11} + b_{22}$ foi de $-1,87 \pm 0,23$, isto indica que o valor da curvatura é muito maior que o erro padrão. A existência de termos quadráticos é significativa.

Os resultados da análise de variância mostram que o modelo de regressão obtido não é significativo estatisticamente ($R^2 = 0,54$, $p = 0,45$) (Tabela 33), significando ser a aproximação polinomial de primeira ordem pouco adequada na região estudada.

A Figura 33 mostra a representação tridimensional da superfície de resposta do projeto de primeira ordem.

Figura 33: Representação tridimensional da superfície de resposta do modelo de primeira ordem da relação entre a temperatura, o valor de pH e a concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina.

Figura 34: Contornos da equação de primeira ordem obtida da relação entre a temperatura, o valor de pH e a concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina.

Os contornos da equação ajustada são mostrados na Figura 34. Observam-se linhas paralelas onde a concentração de sólidos solúveis aumenta com o aumento da temperatura e do valor de pH simultaneamente.

Os resultados da concentração de sólidos solúveis da carne bovina hidrolisada com bromelina de suco de abacaxi em toda a região estudada (Experimentos 1 a 14) podem ser vistos nas Tabelas 32 e 34.

A Tabela 35 composição para um projeto de segunda ordem proposto para estimar a concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina a partir de dados de temperatura e de valor de pH.

A equação de segundo grau ajustada por regressão múltipla dos 14 resultados do modelo composto (Tabelas 32 e 34) é:

$$\hat{y} = 7,13 - 1,02 x_1 + 0,81 x_2 + 0,45 x_1.x_2 - 0,42 x_1^2 - 1,52 x_2^2$$

(Equação 2)

onde : $\hat{y}$ = concentração de sólidos solúveis (g/100g)

x_1 = temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

x_2 = valor de pH

Tabela 34: Resultados do modelo fatorial composto de segunda ordem para concentração de sólidos solúveis (C.S.S.) de hidrolisados de carne bovina.

exp.	variáveis nas unidades originais		variáveis nas unidades codificadas		*	**
	temp. (°C)	valor de pH	x1	x2	C.S.S. (g/100g)	C.S.S. (g/100g)
8	32	5,75	-1,41	0,00	4,9	4,9
9	88	5,75	+1,41	0,00	7,7	7,7
10	60	1,86	0,00	-1,41	2,8	3,0
11	60	9,64	0,00	+1,41	5,4	5,2
12	60	5,75	0,00	0,00	7,2	7,2
13	60	5,75	0,00	0,00	7,2	7,2
14	60	5,75	0,00	0,00	7,2	7,2

* dados experimentais

** dados estimados pelo modelo de segunda ordem

Tabela 35: Modelo de regressão linear múltipla de segunda ordem para estimar a concentração de sólidos solúveis (C.S.S.) (g/100g) a partir de dados de temperatura e de valor de pH.

variável independente	coeficiente regressão	erro padrão	t-Student	nível descritivo	R ²	F
constante	7,13	0,07	101,23	0,00	0,993	215,00*
x1	1,02	0,06	16,71	0,00		
x2	0,81	0,06	13,26	0,00		
x1 ²	-0,42	0,06	- 6,52	0,00		
x2 ²	-1,52	0,06	-23,87	0,00		
x1.x2	0,45	0,08	5,21	0,001		

* p = 0,0000

O significado estatístico dos termos quadráticos pode ser interpretado como respostas curvilíneas de concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina. Esta aumenta com o aumento da temperatura e do valor de pH.

Os parâmetros do ajuste do modelo de segundo grau obtidos são significativos estatisticamente ($R^2 = 0,993$, $p = 0,00$) (Tabela 35).

A Figura 35 mostra a representação tridimensional da superfície de resposta do modelo de segundo grau da relação entre a temperatura, o valor de pH e a concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina.

Os contornos da equação ajustada são mostrados na Figura 36. Observam-se as linhas de contorno para a concentração de sólidos solúveis caminhando em direção a uma região de máximo com o aumento da temperatura e do valor de pH. Nota-se que o máximo encontra-se fora da região experimental.

A equação do modelo da concentração de sólidos solúveis da carne bovina na forma canônica é:

$$\hat{y} - 8,1 = -0,38 X_1^2 - 1,57 X_2^2$$

$$\text{onde : } Y_s = 8,1 \text{ g/100g}$$

$$\lambda_{11} = -0,38$$

$$\lambda_{22} = -1,57$$

$$X_1 \text{ e } X_2 = \text{novas coordenadas na forma canônica}$$

Figura 35: Representação tridimensional da superfície de resposta do modelo de segunda ordem da relação entre a temperatura, o valor de pH e a concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina.

Figura 36: Contornos da equação de segunda ordem obtida da relação entre a temperatura, o valor de pH e a concentração de sólidos solúveis de hidrolisados de carne bovina.

As coordenadas do ponto de máximo são $X_{1s} = 1,48$ ($89,5^{\circ}\text{C}$) e $X_{2s} = 0,49$ (valor de $\text{pH} = 7,1$). Nota-se que a coordenada $X_{1s} = 1,48$ é maior que 1,41, limite de x_1 para a região experimental.

Os sinais dos dois coeficientes negativos indicam um ponto estacionário de máximo. O ponto estacionário encontra-se fora da região experimental ($\lambda_{11} \ll \lambda_{22}$) e a superfície de resposta é alongada na direção de x_1 , isto é, no sentido da temperatura. A superfície é do tipo parabolóide elíptica.

5.4.3 - Condições ótimas do processo

A Figura 37 apresenta os contornos resultantes do acoplamento dos modelos matemáticos de segundo grau ajustados das relações entre a temperatura, o valor de pH e a atividade enzimática da bromelina de suco de abacaxi (Equação 1) e, a temperatura, o valor de pH e a concentração de sólidos solúveis da carne (Equação 2).

O acoplamento dos contornos dos modelos permite definir o ponto que representa as melhores condições para o processo.

A observação da Figura 37 permite a verificação do encontro das regiões de máximas atividade enzimática e concentração de sólidos solúveis da carne simultaneamente.

Observa-se que as condições ótimas indicadas pelo modelo matemático para a atividade enzimática atendem a condições satisfatórias de teores de sólidos solúveis da carne bovina

LEGENDA

P = condições ótimas do processo

TEMPERATURA = $66,8^{\circ}\text{C}$

VALOR DE pH = 6,4

A.E. = 175,94 ug.ml/min

C.S.S. = 7,6 g/100g

● A.E. (ug/ml.min) ● C.S.S. (g/100g)

Figura 37: Contornos resultantes do acoplamento dos modelos matemáticos de segundo grau das relações entre a temperatura, o valor de pH com a atividade enzimática da bromelina de suco de abacaxi e a concentração de sólidos solúveis para otimização biotecnológica de hidrolisados de carne bovina.

hidrolisada.

Substituindo-se então as coordenadas codificadas do ponto estacionário de máximo da atividade, $X_{1s} = 0,34$ e $X_{2s} = 0,24$ no modelo da concentração de sólidos solúveis (Equação 2), obtem-se o valor ótimo de sólidos solúveis, isto é 7,6 g/100g.

Portanto, as condições ótimas do processo indicadas pelo acoplamento dos modelos referem-se ao valor de pH 6,4 e a temperatura 66,8 °C onde a atividade enzimática da bromelina é 175,94 ug/ml.min e a concentração de sólidos solúveis da carne é 7,6 g/100g.

VI - CONCLUSOES

- 1 - Existe efeito de interação entre o valor de pH e a temperatura na atividade da bromelina sobre a caseína.
- 2 - Existe efeito de interação entre o valor de pH e a temperatura na atividade da bromelina de suco de abacaxi sobre a caseína.
- 3 - A enzima presente no suco "in natura" apresenta atividade sobre a caseína superior a bromelina isolada purificada.
- 4 - Os efeitos do tipo de enzima e da temperatura simultaneamente não afetam a solubilidade alcançada pelas proteínas da carne bovina hidrolisadas com bromelina.
- 5 - Hidrolisados de carne bovina inoculados com esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 a valor de pH 4,5 não apresentaram sobreviventes mesmo aos 30 segundos de tratamento térmico.
- 6 - Os valores do tempo de redução decimal (D) de esporos de Bacillus stearothermophilus foram de 0,57 min (pH 5,6) e de 0,96 min (pH 6,6).
- 7 - Os valores Z de esporos de Bacillus stearothermophilus foram de 6,3 °C (pH 5,6) e de 5,9 °C (pH 6,6).

- 8 - O modelo matemático para a atividade enzimática de bromelina de suco de abacaxi é:

$$\hat{y} = 171,63 + 13,13 x_1 + 18,25 x_2 + 18,35 x_1.x_2 - 25,59x_1^2 - 53,45 x_2^2$$

A superfície de resposta é do tipo paraboloide elíptica.

- 9 - O valor de pH interfere mais sobre a atividade que a temperatura.
- 10 - O ponto estacionário de máximo para a atividade enzimática, indicado pelo modelo é 66,8 ° e valor de pH 6,4.
- 11 - O modelo matemático para a concentração de sólidos solúveis da carne é:
- $$\hat{y} = 7,13 - 1,02 x_1 + 0,81 x_2 + 0,45 x_1.x_2 - 0,42 x_1^2 - 1,52 x_2^2$$
- A superfície de resposta é do tipo paraboloide elíptica.
- 12 - O ponto estacionário de máximo para concentração de sólidos solúveis, indicado pelo modelo é 89,5 ° e valor de pH 7,1.
- 13 - As condições ótimas indicadas pelo modelo para a atividade enzimática de bromelina de suco de abacaxi atendem a condições satisfatórias de teores de sólidos solúveis.

- 14 - As condições ótimas do processo biotecnológico de hidrólise da carne bovina indicadas pelo acoplamento dos modelos são :

temperatura = 66,8 °C

valor de pH = 6,4

atividade enzimática = 175,94 ug/ml.min

conc. sólidos solúveis = 7,6 g/100g.

VII - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 - ADLER-NISSEN, J. Enzymatic modification of proteins for increased solubility. Abstr.Pap. Am. Chem.Soc., Washington, 1975 . 170 p.
- 2 - AKHANAZAROVA, S. & KAFAROV, V. Experiment optimization in chemistry and chemical engeneering. 2 ed., Moscow, MIR, 309 p., 1982.
- 3 - ANWAR, R.A. Primary structure of insoluble elastin. Methods Enzymol., New York, 82:606-15, 1982.
- 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 - ASGHAR, A.; SAMEJIMA, K.; YASUI, T. Functionality of muscle proteins in gelation mechanisms of structured meat products. CRC Crit. Rev.Food Sci. Nutr., Cleveland, 22(1):27-106, 1985.
- 6 - ASGHAR, A. & YAETES, N.T.M. Muscle characteristics and meat quality of lambs grown on different nutritional planes II. Chemical and biochemical effects. Agric.Biol.Chem., Tokyo, 43(3):437-44, 1979.
- 7 - ASGHAR, A. & HENRICKSON, R.L., Chemical, biochemical, functional and nutritional characteristics of collagen in food systems. Adv. Food Res., New York, 28:231-372, 1982.

- 8 - ASGHAR, A.; PEARSON, A.M.; MAGEE, C.H.; TAHIR, M.A. Effect of ad libitum, maintenance and sub-maintenance feeding, and of compensatory growth on some biochemical properties of muscle from weanling rabbits. J. Nutr., Philadelphia, 111(8):1343-52, 1981.
- 9 - 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.
- 10 - 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.
- 11 - 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.
- 12 - BARUFFALDI, R.; VESSONI PENNA, T.C.; SCHUCH, R.; GIOIELLI, L.A.; PITOMBO, R.N.M.; MACHOSHVILI, I. A.; ABE, L. E. Resistência térmica de esporos de Bacillus stearothermophilus FS 1518 em solução tampão fosfato M/15 (pH=7,0). Rev. Microbiol., São Paulo, 15(3):127-31, 1984.

- 13 - BEHNKE, V.; KISS, E.; NADUARI, V.; RUTTLOFF, 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, New York, Verlag, 1987. p.7-127.
- 15 - BHATT, Y.B.; SUBRAMANYAN, V.R.; DIAS, F.F. The use of starch and skim milk in the regeneration of Bacillus amyloliquefaciens and Bacillus subtilis protoplasts. Lett. Appl. Microbiol., New York, 4(4):77-9, 1987.
- 16 - BIGELOW, W.D. & ESTY, J.R. The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. J.Infect.Dis., Chicago, 27:602-17, 1920.
- 17 - BORNSTEIN, P. & SAGE, H. Structurally distinct collagen types. Annu. Rev. Biochem., Palo Alto, 49:957-1003, 1980.
- 18 - BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. Statistics for experimenters. New York, John Wiley, 1978. p. 510 - 539.
- 19 - BRIGGS, L. The resistance of spores of ten genus Bacillus to phenol, heat and radiation. J. Appl. Bacteriol., Oxford, 29:490-6, 1966.

- 20 - BURTON, H.; PERKIN, A.G.; DAVIES, F.L.; UNDERWOOD, H.M.
Thermal death kinetics of Bacillus stearothermophilus spores at ultra high temperatures. III. Relationship between data from capillary tube experiments and from UHT sterilizers. J. Food Technol., London, 12(2):149-61, 1977.
- 21 - CORFIELD, V.A.; REID, S.J.; BODMER, J.; THOMSON, J.A. A modified protoplast-regeneration protocol facilitating the detection of cloned exoenzyme genes in Bacillus subtilis. Gene, Amsterdam, 30(1):17-22, 1984.
- 22 - DAVID, J.R.D. & MERSON, R.L. Kinetic parameters for inactivation of Bacillus stearothermophilus at high temperatures. J. Food Sci., Chicago, 55(2):488-93, 1990.
- 23 - DAVIES, F.L.; UNDERWOOD, H.M.; PERKIN, A.G.; BURTON, H.
Thermal death kinetics of Bacillus stearothermophilus spores at ultra high temperatures. I. Laboratory determination of temperature coefficients. J. Food Technol., London, 12(2):115-29, 1977.
- 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 - EL-GHARBAWI, M. & WHITAKER, J.R. Factor affecting enzymatic solubilization of beef proteins. J. Food Sci., Chicago, 28(2):168-72, 1963.

- 26 - EL-GHARBAWI, M. & WHITAKER, J.R. Fractionation and partial characterization of the proteolytic enzymes of stem bromelain. Biochemistry, Washington, 2(3):476-81, 1963.
- 27 - FLORKOWSKI, W. J. & PURCELL, J.C. Commercialization of a oil-seed biotechnology economic implications for secondary agricultural areas. J. Am. Oil Chem. Soc., Chicago, 66(10):1504-6, 1989.
- 28 - FOEGEDING, E.A. Thermally induced changes in muscle proteins. Protein unfolding and protein-protein interactions affect the textural properties of processed meats. Food Technol., Chicago, 42(6):58-64, 1988.
- 29 - FOSTER, J.A. Elastin structure and biosynthesis. Methods Enzymol., New York, 82:559-70, 1982.
- 30 - FOSTER, J.A.; RICH, C. DESA, M.D. Comparison of aortic and ear cartilage tropoelastins isolated from lathyrotic pigs. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 626(2):383-9, 1980.
- 31 - 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.
- 32 - 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.

- 33 - HARLANDER, S. Introduction to biotechnology. Food Technol., Chicago, 44(7):44-8, 1989.
- 34 - HARTLEY, B.S. Proteolytic enzymes. Annu. Rev. Biochem., Palo Alto, 29:45-72, 1960.
- 35 - HEINICKE, R.M. & GORTNER, W.A. Stem bromelain - A new protease preparation from pineapple plants. Econ. Bot., New York, 11:225-34, 1957.
- 36 - HENRICKSON, R.L. & ASGHAR, A. Post-mortem stimulation of carcasses: effects on biochemistry, microbiology, and quality of meat. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr., Cleveland, 18(1):1-58, 1983.
- 37 - HERSON, A.C. & HULLAND, E.D. Canned foods. an introduction to their microbiology. 5.ed., New York, Chemical Publishing, 1964. 291 p.
- 38 - HERSON, A.C. & HULLAND, E.D. Canned foods. thermal processing and microbiology. 7.ed., New York, Chemical Publishing, 1981. 380 p.
- 39 - HIGASHI-FUJIME, S. Phosphorylation of myosin light chain modulates the in vitro movement of fibrils composed of actin and myosin filaments from skeletal muscle. J. Biochem., Tokyo, 94(5):1539-45, 1983.
- 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 - HOFMAN, K. Ph. A quality criterion for meat. Fleischwirtsch., Frankfurt, 68(1):67-70, 1988.
- 43 - HSIEH, F.; FIELDS, M.L.; LI, Y.; HUFF, H.E. Ultra-high temperature effect on Bacillus stearothermophilus during puffing of rice. J.Food Qual., Connecticut, 12:345-54, 1989.
- 44 - 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.
- 45 - HUFFMAN, D.L.; PALMER, A.Z.; CARPENTER, J.W.; SHIRLEY, R.L. Effect of ante-mortem injection of papain on tenderness of chickens. Poult. Sci., Champaign, 40:1627-30, 1961.
- 46 - INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (ITAL). Abacaxi. Campinas, 1987. 285 p. [Série Frutas Tropicais, n.2].
- 47 - 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.
- 48 - JONSSON, V.; SNYGG, B.G.; HARNULV, B.G.; ZACHRISSON, T. Testing two models for the temperature dependence of the heat inactivation rate of Bacillus stearothermophilus spores. J.Food Sci., Chicago, 42:(5):1251-2, 1977.

- 49 - KAGAN, H.M. & SULLIRAN, K.A. Lysyl oxidase: preparation and role in elastin biosynthesis. Methods Enzymol., New York, 82A:637-50, 1982.
- 50 - KANG, C.K. & RICE, E.E. Degradation of various meat fractions by tenderizing enzymes. J. Food Sci., Chicago, 35:563-5, 1970.
- 51 - KANG, C.K. & WARNER, W.D. Tenderization of meat with papaya latex proteases. J. Food Sci., Chicago, 39:812-8, 1974.
- 52 - 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.
- 53 - KATO, A. & NAKAI, S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 624(1):13-20, 1980.
- 54 - KAUZMANN, W. Some factors in the interpretation of protein denaturation. Adv. Protein Chem., New York, 14:1-63, 1959.
- 55 - KHABATAKE, N. & DOI, E. Heat-induced transparent gel prepared from pepsin-treated ovoalbumin and egg white. Agric. Biol. Chem., Tokyo, 49(8):2457-2458, 1985.
- 56 - KILARA, A. Enzyme-modified protein food ingredients. Process Biochem., London, 20(5):149-57, 1985.

- 57 - KILARA, A. & SHARKASI, T.Y. Effects of temperature on food proteins and the implications on functional properties. CRC Crit. Rev. Food Sci. and Nutr., Cleveland, 23(4):323-95, 1986.
- 58 - KOBAYASHI, H.; KUSAKABE, I.; MURAKAMI, K. Substrate specificity of the milk clotting enzyme from Irpex lacteus on alfaS1-casein. Agric. Biol. Chem., Tokyo, 49(6):1611-19, 1985.
- 59 - 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.
- 60 - KURODA, M. & MASAKI, T. Extractibility of 2.000 dalton proteins from myosin-removed myofibrils at low ionic strength. J. Biochem., Tokyo, 88(2):605-8, 1980.
- 61 - KURODA, M.; TANAKA, T.; MASAKI, T. Eu-actinin, a new structural protein of the Z-line of striated muscles. J. Biochem., Tokyo, 89(1):297-310, 1981.
- 62 - LABUZA, T.P. & RIBOH, D. Theory and application of Arrhenius kinetics to the prediction of nutrient losses in foods. Food Technol., Chicago, 36(10):66-100, 1982.
- 63 - LAZARIDES, E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. Nature, London, 283:249-56, 1980.

- 64 - LAZARIDES, E. Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. Annu. Rev. Biochem., Palo Alto, 51:219-50, 1982.
- 65 - LEAL, E.L.; CAMARGO, C.; CALLE, O.L. Obtenção de uma preparação de bromelina bruta a partir de los desechos de la piña (Ananas comosus) e sua aplicação na elaboração de queijos. Frutas Trop., Bogotá, 4:43-59, 1980.
- 66 - LI-CHAN, E.; NAKAI, S.; WOOD, D.F. Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relation to emulsifying properties. J. Food Sci., Chicago, 49(2):345-50, 1984.
- 67 - LIENER, I.E. The sulphydryl proteases. Adv. Chem.Ser., Washington, 136:203-19, 1974.
- 68 - LIMA, D.C. de & ROMANELLI, P.F. Extração e estudo de algumas propriedades bioquímicas do ênzimo proteolítico do caule do abacaxi branco, variedade Pérola. Colet. Inst.Tecnol.Aliment., Campinas, 8:377-89, 1977.
- 69 - 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.
- 70 - LUND, D.B. Design of thermal processes for..... maximizing nutrient retention. Food Technol., Chicago, 31(2):71-8, 1977.

- 71 - MALLIDIS, C.G. & SCHOLEFIELD, J. Evaluation of recovery media for heated spores of Bacillus stearothermophilus. J. Appl. Bacteriol., Oxford, 61(6):517-23, 1986.
- 72 - MANLEY, C.H.; MCCANN, J.S.; SWAINE, R.L.Jr. Quality of foods and beverages:chemistry and technology. 1981. v.1, p.61-82.
- 73 - MARUYAMA, K. & EBASHI, S. alfa-Actinin, a new structural protein from striated muscle. II Action on Actin. J. Biochem., Tokyo, 58:13-9, 1965.
- 74 - MARUYAMA, K.; KIMURA, S.; OHASHI, K.; KUWANO, Y. Connectin, an elastic protein of muscle. Identification of titin as connectin. J. Biochem., Tokyo, 89(3):701-9, 1981.
- 75 - MCINTOSH, E.N. & CARLIN, A.G. The effect of papain preparations on beef skeletal muscle proteins. J. Food Sci., Chicago, 28:283-5, 1963.
- 76 - MIETSCH, F.; BARATH, A.; HALASZ, A. Investigation of the dependence of certain functional properties of proteins on the degree of hydrolysis. Nahrung, Berlin, 30(3-4):419-21, 1986.
- 77 - MIETSCH, F.; FEHER, J.; HALASZ, A. Investigation of functional properties of partially hydrolysed proteins. Nahrung, Berlin, 33:1-9, 1989.

- 78 - MIKOLAJCIK, E.M. & RAJKOWSKI, K.T. Simple technique to determine heat resistance of Bacillus stearothermophilus spores in fluid systems. J. Food Prot., Ames, 43(10):799-804, 1980.
- 79 - MILLER, E.J. & GAY, S. Collagen. An overview. Methods Enzymol., New York, 82A:3-32, 1982.
- 80 - MIYAHARA, M. & NODA, H. Interaction of C-protein with myosin. J. Biochem., Tokyo, 87(5):1413-20, 1980.
- 81 - MIYAHARA, M.; KISHI, K.; NODA, H. F-protein: a myofibrillar protein interacting with myosin. J. Biochem., Tokyo, 87(5):1341-5, 1980.
- 82 - MIYANISHI, T. & TONOMURA, Y. Location of the non-identical two reactive lysine residues in the myosin molecule. J. Biochem., Tokyo, 89(3):831-9, 1981.
- 83 - MOORE, D.J. & CAYGILL, J.C. Proteolytic activity of malaysian pineapples. Trop. Sci., London, 21(2):97-102, 1979.
- 84 - MURACHI, T. Bromelain enzymes. Methods Enzymol., New York, 19:273-84, 1970.
- 85 - NEY, K.H. Flavor enhancing effect of L-glutamate and similar compounds. Unters. Forsch., Hamburg, 146:141-3, 1971.

- 86 - 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.
- 87 - 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.
- 88 - OTAKA, F. & HONGO, F. Digestion of beef by various proteolytic enzymes. J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol., Tokyo, 12(3):101-5, 1965.
- 89 - 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.
- 90 - PENDURKAR, S.H. & HULKARNI, P.R. Heat resistance of *Bacillus* spores exposed to food processing conditions. Nahrung, Berlin, 34(2):177-80, 1990.
- 91 - 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.
- 92 - PERKIN, A.G.; BURTON, H.; UNDERWOOD, H.M.; DAVIES, F.L. Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra high temperatures. II. Effect of heating period on experimental results. J. Food Technol., London, 12(2):131-48, 1977.

- 93 - PETERSEN, B.R. The impact of enzymic hydrolysis process on recovery and use of proteins. In: BIRCH, G.G.; BLAKEBROUGH, N.; PARKER, K.J. Enzymes and food processing. London, Applied Science Publishers, 1981. p.149-75.
- 94 - PFLUG, I. J. Thermal resistance of Bacillus stearothermophilus in parenteral solutions. Bull. Parenter. Drug Assoc., Philadelphia, 30(3):128-30, 1976.
- 95 - PFLUG, I. J. Principles of thermal destruction of microorganisms. In: BLOCK, S.S. Desinfection, sterilization and preservation, 3. ed., Philadelphia Leo & Febiger, 3.ed., 1983. p.751-810.
- 96 - PRIVALOV, P.L. Stability of proteins which do not present a single cooperative system. Adv. Protein Chem., New York, 35:1-104, 1982.
- 97 - 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.
- 98 - QUAST, D.G. Cálculo da intensidade de esterilização e de cozimento de alimentos. Campinas, ITAL, 1976, p.1-59. [Instruções Técnicas n. 10].

- 99 - 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.
- 100 - 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.
- 101 - 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.
- 102 - 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.
- 103 - SANOGO, T.; PAQUET, D.; AUBERT, F.; LINDEN, G. Proteolysis of s1-casein by papain in a complex environment. Influence of ionic strenght on the reaction products. J.Food Sci., Chicago, 55(3):796-800, 1990.
- 104 - SANOGO, T.; PAQUET, D.; LINDEN, G. Proteolysis of s1-casein by papain in a complex environment. Influence of ionic strenght on the kinetics constants. J.Food Sci., Chicago, 55(3):801-4, 816, 1990.
- 105 - SCHIMID, R.D. Biotechnology : application to oleochemistry. J. Am. Oil Chem. Soc., Chicago, 64(4):563-70, 1987.

- 106 - SHIMOKOMAKI, M. Textura da carne. Bol. Inst. Tecnol. Aliment., Campinas, 33:43-56, 1973.
- 107 - SHIMOKOMAKI, M. Colágeno da cartilagem articular: caracterização bioquímica e localização por imunofluorescência. São Paulo, 1981. 190 p. [Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP].
- 108 - SHIMOKOMAKI, M. Ligações cruzadas em colágenos da cartilagem. São Paulo, 1989. 100 p. [Tese de Livre-Docência - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP].
- 109 - SILVA, C. E. M. & AROLA, F. M. Bromelina. Bol. Soc. Bras. Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas, 51:24-42, 1980.
- 110 - STABILE, M.N.O. & BARUFFALDI, R. Grau de hidrólise e solubilidade de hidrolisados protéicos de clara de ovo. Bol. Cent.Pesqui. Process. Aliment., Curitiba, 6:79-86, 1988.
- 111 - STABILE, M.N.O. Hidrolisados de carne bovina - Biotecnologia de obtenção. São Paulo, 1989. 166p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP].
- 112 - STABILE, M.N.O.; BARUFFALDI, R.; BECKERS, W.; NACCO, R. Influência da formulação na perda de peso e na retração de hamburger assado em forno de microondas. Bol. Cent.Pesqui. Process. Aliment., Curitiba, 8(1):1-9, 1990.

- 113 - STABILE, M.N.O.; BARUFFALDI, R.; STEDEFELDT, E.; BASILIO, M.C.; PINTO E SILVA, M.E.; NIETO, R.A.; ALVARES, E.D. Carne pré-digerida a partir de suco de abacaxi. Aliment. Tecnol., São Paulo, 32:99-104, 1990.
- 114 - STARR, R. & OFFER, G. H-protein and X-protein. Two new components of the thick filaments of vertebrate skeletal muscle. J. Mol. Biol., London , 170(3):675-98, 1983.
- 115 - STERN, J.A. & PROCTOR, B.E. A micro-method and apparatus for the multiple determination of rates of destruction of bacteria and bacterial spores subjected to heat. J.Food.Technol., Chicago, 8:139-43, 1954.
- 116 - STEWART, M. Structure of alfa-tropomyosin magnesium paracrystals. J. Mol. Biol., London, 148(4):411-25, 1981.
- 117 - STEWART, M. & ROBERTS, G.C.K. Nuclear magnetic resonance evidence for a flexible region at the C-terminal of alfa-tropomyosin. J. Mol. Biol., London , 166(2):219-25, 1983.
- 118 - STUMBO, C.R. Thermobacteriology in food processing. New York, Academic Press, 1965, 236 p.
- 119 - STUMBO, C.R. Thermobacteriology in food processing. New York, Academic Press, 1973, 325 p.

- 120 - SUBRAMANIAN, N. Study of bromelain present in the pineapple plant of Paraiba. Cienc. Cult., São Paulo, 30(11):1326-32, 1978.
- 121 - TAKEDA, M. & OKEDA, T. Utilização de carne liofilizada em dietoterapia. Rev.Med.IAMSPE, São Paulo, 1(1):23, 1970.
- 122 - TANFORD, C. Protein denaturation. Part A: Characterization of the denaturated state. Adv. Protein Chem., New York, 23:121-282, 1968.
- 123 - TANFORD, C. Protein denaturation. Part C: theoretical models for the mechanism of denaturation. Adv. Protein Chem., New York, 24:1-95, 1970.
- 124 - TISSEAU, R. Valorization de déchet de conserverie d'ananas. Possibilités d'extraction de bromeline. Fruits, Paris, 41(12):703-8, 1986.
- 125 - 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.
- 126 - TRINICK, J.A. End-filaments: a new structural element of vertebrate skeletal thick filaments. J. Mol. Biol., London, 151(2):309-14, 1981.

- 127 - TROUT, G.R. & SCHIMIDT, G.R. The effect of cooking temperature on the functional properties of beef proteins: the role of ionic strength, pH, and phosphate. Meat Sci, Barking, 20:129-47, 1987.
- 128 - 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.
- 129 - VITOLO, M. Obtenção e uso de enzimas industriais. Biotecnologia, Piracicaba, 15:1-2, 1988.
- 130 - WAKABAYASHI, T. & TOYOSHIMA, C. Three-dimensional image analysis of the complex of thin filaments and myosin molecules from skeletal muscle. II. The multi-domain structure of actin-myosin S1 complex. J. Biochem., Tokyo, 90(3):683-701, 1981.
- 131 - WANG, D. I-C.; SCHARER, J.; HUMPHREY, A.E. Kinetics of death of bacterial spores at elevated temperatures. Appl. Microbiol., Bethesda, 12:451-4, 1964.
- 132 - WHITAKER, J.R. Principles of enzymology for the food sciences. New York, Dekker, 1972. v.2, p.511-42.
- 133 - WIELAND, H. Enzymes in food processing and products. New Jersey, Noyes, 1972. p.130-63.
- 134 - YAMAMOTO, A. Proteolytic enzymes. In: REED, G., ed. Enzyme in food processing, 2. ed., New York, Academic Press, 1975. p.123-79.

- 135 - YATES, L.D. & GREASER, M.L. Quantitative determination of myosin and actin in rabbit skeletal muscle. J. Mol. Biol., London, 168(1):123-41, 1983.
- 136 - ZAR, J.H. Biostatistical analysis. 2. ed., New Jersey, Prentice-Hall International, 1984.

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma preconizada NB 66/78 pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE INDEX (CASSI), Columbus, 1990.