

OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS ENZIMÁTICOS UTILIZANDO PESCADO DE BAIXO VALOR COMERCIAL

Sarita D'Ávila dos Santos, Vilásia Guimarães Martins, Myriam Salas-Mellado e Carlos Prentice-Hernández*
Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, CP 474, 96201-900 Rio Grande – RS, Brasil

Recebido em 6/12/07; aceito em 10/7/08; publicado na web em 2/12/08

OPTIMIZATION OF THE PRODUCTION PARAMETERS FOR ENZYMATIC PROTEIN HYDROLYZED USING LOW COMMERCIAL VALUE FISH. The enzymatic modification of proteins has been widely studied with the aim of add value to low commercial value fish. The objective of this work was to evaluate and optimize the parameters involved in the production process of an enzymatic protein hydrolyzed with high protein content. The results showed that for Alcalase the most significant parameters were temperature, pH and substrate concentration and for Flavourzyme were pH, substrate concentration and enzyme concentration. It was obtained for Alcalase a predictive model for the recovered nitrogen and for Flavourzyme a predictive model for the hydrolysis degree.

Keywords: fish; hydrolysis degree; recovered nitrogen.

INTRODUÇÃO

A preparação de hidrolisados protéicos a partir de subprodutos da indústria processadora de pescado tem recebido mais atenção nestes últimos anos e muitos estudos têm sido realizados sobre a avaliação das condições para a hidrólise e as propriedades funcionais do hidrolisado protéico de pescado baseado no produto inteiro, filé ou músculo.

Uma grande quantidade de co-produtos do processamento de pescado é descartada diariamente pela indústria pesqueira. Em busca de alternativas viáveis para este problema, propõe-se o uso de pescado de baixo valor comercial para o desenvolvimento de processos com o intuito de recuperação ou alteração das proteínas musculares do pescado visando seu uso como ingredientes funcionais em alimentos. A modificação enzimática de proteínas utilizando enzimas proteolíticas vem sendo uma alternativa promissora para resolver o problema do descarte excessivo, agregando valor nutricional e comercial ao pescado.¹⁻³

A hidrólise protéica de pescado usando enzimas proteolíticas selecionadas possibilita o controle do grau de clivagem das proteínas no substrato. A utilização de proporções adequadas de enzima/substrato e tempos de reação permite a produção de hidrolisados com diferentes estruturas moleculares e diferentes propriedades funcionais que podem encontrar aplicações em várias formulações alimentícias.⁴

As enzimas microbianas, em comparação com as de animais e plantas, oferecem várias vantagens, incluindo ampla variedade de atividades catalíticas disponíveis, e grande estabilidade para pH e temperatura. O hidrolisado protéico resultante tem propriedades peculiares de acordo com os novos peptídeos gerados.⁵

A hidrólise enzimática das proteínas é um processo complexo devido às muitas ligações peptídicas e sua acessibilidade específica para reações enzimáticas.⁶ A especificidade das enzimas não é o único fator que afeta o perfil dos peptídeos no produto final. Fatores ambientais, tais como temperatura e pH, também são extremamente importantes. Tanto a temperatura como o pH afetam extensivamente a cinética das reações enzimáticas, e o efeito destes fatores é diferente para cada enzima.²

Este trabalho teve a pretensão de desenvolver um produto viável economicamente para a indústria de alimentos, obtendo hidrolisados protéicos enzimáticos com propriedades funcionais adequadas para consumo humano direto. O objetivo deste trabalho foi avaliar as variáveis envolvidas com a obtenção de um hidrolisado enzimático a partir de duas espécies de pescado de baixo valor comercial, tendo como agentes de hidrólise duas proteases microbianas, a Alcalase e a Flavourzyme.

PARTE EXPERIMENTAL

Matéria-prima

Foram utilizadas as espécies cabrinha (*Prionotus punctatus*) e corvina (*Micropogonias furnieri*), provenientes de empresas processadoras de pescado da cidade do Rio Grande, estado do Rio Grande do Sul. O pescado foi transportado em recipientes com gelo até o Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), onde foi realizado o processamento. Assim, o pescado foi, imediatamente, lavado com água clorada 5 ppm, descabeçado, eviscerado e filetado. Os filés foram acondicionados em embalagens plásticas de polietileno e armazenados sob congelamento a -18 °C até a utilização.

Caracterização da matéria-prima

Os filés foram homogeneizados e caracterizados de formas física e química (pH e rendimento, proteína, gordura, umidade e cinzas). O pH foi medido através da utilização de potenciômetro de bancada e o rendimento foi calculado a partir do peso inicial do pescado em relação ao peso dos filés obtidos, o que possibilitou a determinação do balanço de massa final do processo. As demais análises foram realizadas de acordo com a AOAC.⁷ Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Enzimas microbianas

O processo enzimático foi realizado com Alcalase 2.4 L que é uma endopeptidase bacteriana produzida a partir do *Bacillus licheniformis*

*e-mail: dqmprent@furg.br

que possui atividade enzimática ótima entre 50 e 70 °C e a valores de pH entre 6,0 e 10,0.⁸ A Flavourzyme é um complexo de protease/peptidase produzido por fermentação submersa de uma linhagem selecionada do fungo *Aspergillus oryzae*. As condições ótimas de trabalho para a Flavourzyme 500 L relatadas são pH entre 5,0 e 7,0 com temperatura ótima em torno de 50 °C.¹ As enzimas utilizadas foram adquiridas da empresa Novozymes.

Processo de obtenção do hidrolisado enzimático de pescado

Para a obtenção do hidrolisado protéico, a amostra foi homogeneizada com o tampão correspondente ao pH desejado na proporção de 5:1 (tampão:pescado). As hidrólises foram realizadas em dois reatores de vidro, encamisados e abertos de 250 mL conectados em série, juntamente com um banho ultratermostático (Quimis®, modelo 214.D2) e dois agitadores eixo-hélice (Tecnal, modelo TE-039/1 e Quimis®, modelo Q-251D2K). Todos os níveis de variações dos parâmetros avaliados estão descritos na Tabela 1. Para o início da hidrólise foi adicionada enzima e foi realizado o controle de temperatura, pH e tempo da reação. Após transcorrido o tempo de reação, as enzimas foram inativadas termicamente por 15 min a diferentes temperaturas e a secagem dos hidrolisados foi realizada em estufa com circulação de ar a 60 °C por 10 h.

Planejamento experimental

Para cada enzima em estudo foram realizados dois tipos de planejamento experimental. No planejamento inicial, o intuito foi verificar quais variáveis do processo de hidrólise enzimática influenciavam no grau de hidrólise, por isso a opção foi por um *screening design* do tipo Plackett-Burman, com oito variáveis de entrada estudadas em dois níveis para cada enzima. A Tabela 1 mostra os níveis para cada variável independente estudada. Como resposta foi avaliado o grau de hidrólise (%GH) apresentado pelos hidrolisados finais de cada ensaio, sendo as determinações realizadas em triplicata. Foram realizados 3 pontos centrais para cada espécie de pescado estudada.

A partir dos resultados obtidos com o primeiro planejamento foi realizado um segundo planejamento, sendo este um fatorial completo do tipo 2³ para cada enzima. O objetivo deste planejamento foi otimizar os resultados obtidos em relação ao grau de hidrólise. Para a enzima Alcalase foram analisadas como variáveis independentes a temperatura, pH e concentração do substrato e foram mantidos fixos os parâmetros concentração de enzima em 0,5 g_{enzima} g⁻¹ pescado, a espécie cabrinha e o tempo de hidrólise em 60 min. Para a enzima Flavourzyme, as variáveis independentes escolhidas foram pH, concentração da enzima e concentração do substrato e foram mantidos fixos a temperatura de 50 °C e a espécie cabrinha por um tempo de

Tabela 1. Valores das variáveis do planejamento do tipo Plackett-Burman e seus respectivos níveis codificados

Variáveis	-1	0	+1
Temperatura (°C)	50	55	60
Espécie de pescado	cabrinha	---	corvina
pH – Alcalase	8,0	8,5	9,0
pH – Flavourzyme	6,0	6,5	7,0
Tempo (min)	60	90	120
Concentração enzima (%)	0,5	1,25	2,0
Concentração substrato (g mL ⁻¹)	1,0	1,5	2,0
Temperatura inativação (°C)	80	85	90

reação de 120 min. As variáveis independentes e seus respectivos níveis para cada enzima estão apresentados na Tabela 2. As respostas avaliadas foram %GH e o Nitrogênio Recuperado (%NR).

Tabela 2. Variáveis do planejamento fatorial completo 2³ e respectivos níveis codificados para as enzimas Alcalase e Flavourzyme

Enzima	Variáveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Alcalase	Temperatura (°C)	43,2	50	60	70	76,8
	pH	7,16	7,5	8,0	8,5	8,84
	[] Substrato (mg mL ⁻¹)	160	500	1000	1500	1840
Flavourzyme	pH	6,16	6,5	7,0	7,5	7,84
	[] Enzima (mg g ⁻¹)	3,2	10	20	30	36,8
	[] Substrato (mg mL ⁻¹)	160	500	1000	1500	1840

Os níveis estudados para as variáveis independentes dos planejamentos utilizados para a obtenção dos hidrolisados enzimáticos de pescado de baixo valor comercial foram baseados nas condições de trabalho de cada enzima, segundo recomendação de diferentes autores.^{1,8-14}

Grau de hidrólise

A reação foi inativada com adição de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 6,25%. Após repouso de 10 min as proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry *et al.*¹⁵ As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro Kary 100 UV visível a 750 nm. O grau de hidrólise foi medido segundo método descrito por Hoyle e Merrit¹⁴ e por Liceaga-Gesualdo e Li-Chan,¹⁶ calculado segundo a Equação 1.

$$\%GH = \frac{\text{Proteína Solúvel}}{\text{Proteína Total Amostra}} * 100 \quad (1)$$

Nitrogênio recuperado

O nitrogênio recuperado foi avaliado segundo método descrito por Benjakul e Morrissey,¹² onde, após a hidrólise, o sobrenadante é separado por centrifugação a 6000 x g por 30 min. Foi medido o nitrogênio total presente no sobrenadante e comparado com o nitrogênio total do substrato. A determinação do nitrogênio total foi realizada pelo método de Kjeldahl⁷. A %NR foi calculada pela Equação 2.

$$\%NR = \frac{\text{Ntotal Sobrenadante (mg)}}{\text{Ntotal Substrato (mg)}} * 100 \quad (2)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação de pH

A polpa da cabrinha apresentou valor de pH 6,7 enquanto que a de corvina apresentou valor de pH 6,8, demonstrando estarem na faixa ideal de qualidade, já que o pH do músculo, segundo autores como Maldonado¹⁷ e Contreras-Guzmán¹⁸ está entre 6,5 e 7,0 para pescado capturado em alto mar. O mesmo é afirmado por Martin,¹⁹ pois o pH é um parâmetro importante e pode definir a qualidade de um alimento. O pH pode ser afetado por reações que ocorrem após a

morte do animal e indica a presença de microrganismos que, através de seu metabolismo, causam acúmulo de material metabólico alcalino, o que eleva o valor do pH, diminuindo a qualidade do alimento.

Rendimento dos filés de pescado

O rendimento foi avaliado em dois blocos, cada um em triplicata. Para a cabrinha o rendimento do filé foi de 30,7%, enquanto que para a corvina o valor foi de 35,5%. O baixo rendimento apresentado pela cabrinha é explicado pelo formato deste pescado, pois possui cabeça muito grande quando comparada com o resto do corpo.

Composição centesimal dos filés de pescado

Os pescados utilizados apresentaram composição centesimal muito semelhante. A quantidade de proteína foi de 16,9% para a cabrinha e 17,6% para a corvina. As cinzas totalizaram 1% para ambas as espécies. A cabrinha apresentou 0,3% de lipídios e a corvina 2%, sendo que todos os resultados estão expressos em base úmida. Estes resultados concordam com os publicados por Contreras-Guzmán¹⁸ e Moraes *et al.*²⁰ que para cabrinha obtiveram 79,1% de umidade; 17,4% de proteína; 1,6% de lipídios e 1,4% de cinzas e para corvina obtiveram 76% de umidade, 18,8% de proteína, 2,3% de lipídios e 1,1% de cinzas.

Planejamento preliminar

Os resultados dos efeitos para a variável grau de hidrólise (GH) para as enzimas Alcalase e Flavourzyme utilizando a matriz Plackett-Burman estão apresentados na Tabela 3. Para a enzima Alcalase o menor grau de hidrólise encontrado foi de 15,6%, utilizando corvina, pH 9 a 50 °C, concentração de enzima de 0,5%, concentração de substrato de 2 g mL⁻¹ e inativação enzimática a 90 °C em tempo de reação de 120 min. O maior grau de hidrólise foi de 34,2% e ocorreu quando foi utilizada corvina, pH 8 a 60 °C, concentração de enzima de 0,5%, concentração de substrato 1 g mL⁻¹, temperatura de inativação de 80 °C em período de 120 min. O tempo de reação e a concentração da enzima não foram significativos no processo, demonstrando que as variáveis com maior efeito sobre o processo de hidrólise, neste caso, foram a temperatura, com efeito positivo e o pH e a concentração de substrato, com efeitos negativos. Isto demonstra porque este ensaio obteve o melhor resultado de %GH, pois contempla todas as variáveis de maior efeito nos seus valores, no caso, avaliados como os melhores parâmetros 60 °C; 8,0 e 1 g_{pescado} mL⁻¹_{tampão}. Observando trabalhos anteriores, a Alcalase foi estudada juntamente com a Neutrase, por Benjakul e Morrissey,¹² em resíduos sólidos de pescada a pH 9,5 e 60 °C, onde a Alcalase apresentou atividade consideravelmente maior que a Neutrase, o que levou a uma hidrólise mais eficiente. As condições ótimas para Alcalase foram próximas às obtidas neste trabalho, onde foram utilizados 1 h de reação, proporção substrato:tampão de 1:1 (p v⁻¹), a 60 °C e pH 9,5. Segundo Liceaga-Gesualdo e Li-Chan¹⁶ e Kristinsson e Rasco,²¹ a Alcalase tem mostrado ser a enzima mais economicamente viável quando comparada com outros preparados enzimáticos testados para hidrolisar proteína do músculo de pescado, pois necessita de menor tempo de reação para obter o mesmo grau de hidrólise que outras enzimas.

Para a Flavourzyme a temperatura não apresentou efeito significativo, e as variáveis de maior importância foram o pH (7,0), a concentração da enzima (2,0%) e a concentração do substrato (1 g_{pescado} mL⁻¹). Como demonstrado anteriormente em vários estudos,^{1,9,10,22} a enzima Flavourzyme trabalha melhor perto da neutralidade. Também foi observado que necessita de quantidade maior de enzima quando utilizada em uma mesma concentração de substrato.⁹ Šližytė *et al.*^{1,22}

utilizaram uma quantidade bem inferior de enzima (0,1%), para atingir grau de hidrólise de 18% com subprodutos de bacalhau.

Tabela 3. Efeitos estimados no grau de hidrólise dos hidrolisados protéicos de pescado processados com as enzimas Alcalase e Flavourzyme

Variável	Alcalase		Flavourzyme	
	Grau Hidrólise (%)	<i>P</i>	Grau Hidrólise (%)	<i>P</i>
Temperatura	4,26	0,0027	-0,31	0,4109
Matéria-prima	-1,93	0,0541	-1,93	0,0027
pH	-7,24	0,0002	2,37	0,0011
Tempo	0,63	0,4491	1,14	0,0226
[] Enzima	0,59	0,4791	7,0	0,0000

Para ambas enzimas foi observado que a cabrinha demonstrou comportamento melhor no processo, proporcionando valores maiores de grau de hidrólise. Estudos comparativos de enzimas exógenas, como a alcalase e a Flavourzyme, são complicados pelo fato de que as enzimas possuem diferentes atividades específicas, especificidades e condições ótimas de trabalho. Em alguns casos, como o descrito por Aspino *et al.*,²³ as enzimas proteolíticas têm sido comparadas através do ajuste das condições de hidrólise às condições ótimas descritas pelos processadores, sem considerarem que estas condições ótimas também podem depender do substrato utilizado. Ao avaliar a atuação das enzimas nos substratos estudados foi observado que quando utilizada a espécie cabrinha, ao invés da corvina, o grau de hidrólise obteve aumento de 1,9%.

Planejamento definitivo

Foram consideradas apenas as variáveis significativas ao nível de confiança de 85%. Segundo a literatura, um modelo tem validação estatística quando o valor de F calculado é pelo menos 3 a 5 vezes maior que o valor tabelado.^{24,25}

Alcalase

As respostas apresentadas para o grau de hidrólise e nitrogênio recuperado podem ser visualizadas na Tabela 4. O maior grau de hidrólise obtido neste estudo foi de 34,7%, similar ao obtido com o processamento de hidrolisado de arenque utilizando Alcalase.¹⁶ Diniz e Martin⁸ e Guérard *et al.*⁵ obtiveram resultados de %GH na mesma faixa dos obtidos neste trabalho, onde estes avaliaram o efeito do pH, da temperatura e da proporção enzima-substrato mas obtiveram um modelo preditivo onde todas as variáveis influenciavam. As variáveis da hidrólise foram otimizadas a pH de 8,3; temperatura de 53,6 °C e E S⁻¹ de 3,6% (p p⁻¹).

No caso do hidrolisado protéico de cabrinha, obtido a partir da enzima Alcalase, este não apresentou um modelo preditivo para o grau de hidrólise, pois o valor de F calculado (4,69) não foi três vezes maior que o tabelado (2,17). Para o grau de hidrólise o pH não mostrou efeito significativo, a temperatura apresentou efeito positivo e a concentração do substrato, efeito negativo. Isto significa que a enzima Alcalase trabalha melhor a temperaturas mais elevadas, em torno de 70 °C, e com o substrato menos concentrado, no caso, 500 mg mL⁻¹. Márquez e Vázquez²⁶ trabalharam em faixa mais baixa de temperatura, mas obtiveram os melhores resultados de grau de hidrólise no nível

Tabela 4. Respostas apresentadas para o grau de hidrólise e nitrogênio recuperado para o hidrolisado enzimático de cabrinha obtido com a enzima Alcalase

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	[S] (mg mL ⁻¹)	%GH	%NR
1	-1	-1	-1	33,4	83,1
2	1	-1	-1	34,7	88,5
3	-1	1	-1	33,7	75,7
4	1	1	-1	34,7	80,5
5	-1	-1	1	23,6	85,4
6	1	-1	1	26,5	81,8
7	-1	1	1	23,9	84,2
8	1	1	1	23,6	75,7
9	-1,68	0	0	20,0	81,2
10	1,68	0	0	26,4	45,3
11	0	-1,68	0	18,6	86,9
12	0	1,68	0	21,1	83,6
13	0	0	-1,68	28,8	82,3
14	0	0	1,68	31,4	79,2
15	0	0	0	22,8	87,9
16	0	0	0	21,3	82,2
17	0	0	0	19,6	76,1

mais alto estudado e também obtiveram aumento no grau de hidrólise quando o substrato estava menos concentrado, concordando assim com os resultados obtidos no presente trabalho. A Alcalase mostrou ser termo resistente, concordando com o afirmado por Kristinsson e Rasco,² pois trabalhou melhor em temperatura alta (70 °C).

A resposta nitrogênio recuperado obteve F calculado (7,11) três vezes maior que o F tabelado (2,33), e mostrou a temperatura como variável significativa no processo, originando assim o modelo descrito na Equação 3.

$$\%NR = 84,89 - 4,56T - 6,17T^2 \quad (3)$$

O valor do coeficiente de determinação demonstrou que 71% do comportamento pode ser explicado pelo modelo. Através da análise dos resultados obtidos nos pontos axiais, com relação à temperatura foi observado que no $-\alpha$ foi obtido 81,2% de nitrogênio recuperado e que no $+\alpha$ apenas 45,3%, o menor valor encontrado dentre todos os ensaios. Isto mostra que a temperatura de reação é de suma importância na recuperação do nitrogênio de um hidrolisado, assim como observaram Liaset *et al.*²⁷ com a enzima ProtamexTM. Isto também explica o baixo valor do coeficiente de determinação, pois a temperatura mostrou efeito negativo, o que significa que quanto menor a temperatura da reação maior é o nitrogênio recuperado, o que pode ser observado na Figura 1.

Flavourzyme

Segundo Diniz e Martin,⁸ investigando a hidrólise de proteína de cação por proteases bacterianas, o pH, a temperatura e a proporção enzima-substrato marcadamente influenciaram na clivagem das ligações peptídicas do substrato protéico. O grau de hidrólise depende da enzima utilizada e a Flavourzyme, quando comparada com a Neutrase, causou maior grau de hidrólise. Segundo Slizyte *et*

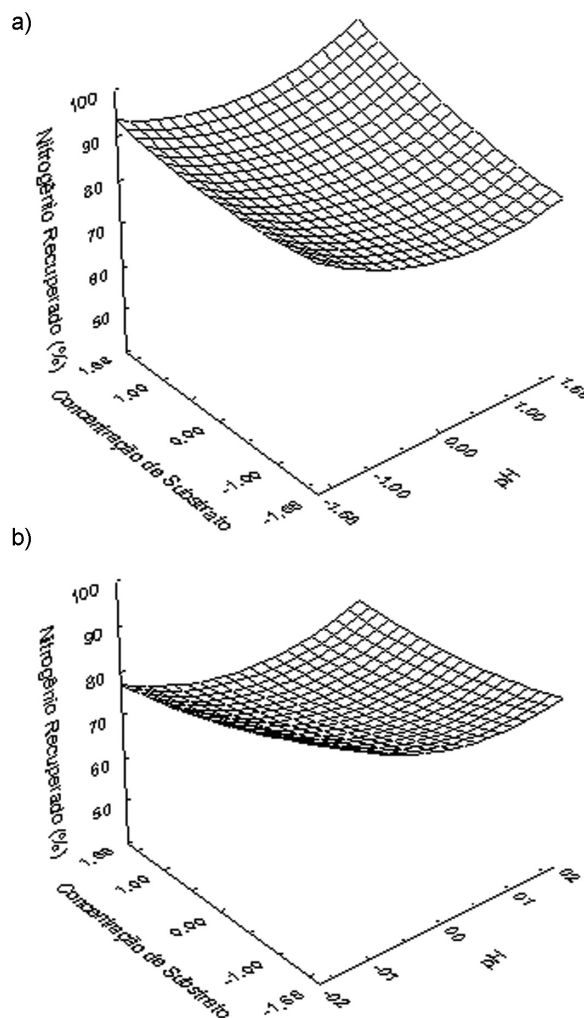


Figura 1. Superfícies de respostas do efeito combinado da concentração de substrato e pH nas temperaturas de (a) 50 °C e (b) 70 °C para a enzima Alcalase em função do nitrogênio recuperado

al.^{1,23} isto é justificado por esta ser uma exopeptidase. As respostas apresentadas pelo grau de hidrólise e nitrogênio recuperado para o hidrolisado enzimático de cabrinha obtido com a enzima Flavourzyme estão apresentadas na Tabela 5. A análise de variância mostrou que o modelo quadrático se ajustou aos dados experimentais quanto ao %GH, pois o F calculado (10,71) foi três vezes maior que o F tabelado (2,21). O valor do coeficiente de determinação demonstrou que 94% do comportamento pode ser explicado pelo modelo.

O modelo para o grau de hidrólise está demonstrado na Equação 4, o qual foi gerado utilizando 85% de confiança. O modelo polinomial mostra que o termo linear de concentração do substrato contribui para a resposta, assim como o pH quadrático e as interações entre todas as variáveis.

$$\%GH = 21,78 - 0,88[S] + 1,04pH^2 + 1,92pH[E] + 0,85pH[S] - 1,76[E][S] \quad (4)$$

Desta forma, o modelo foi utilizado na construção da superfície de resposta, permitindo a visualização do comportamento do hidrolisado enzimático de cabrinha obtido com a enzima Flavourzyme em função das variáveis que apresentaram influência significativa sobre a variável dependente, grau de hidrólise, demonstrado na Figura 2.

Para o nitrogênio recuperado não se obteve um modelo preditivo para a Flavourzyme, pois o valor de F calculado (5,94) não foi três

Tabela 5. Respostas apresentadas para o grau de hidrólise e nitrogênio recuperado para o hidrolisado enzimático de cabrinha obtido com a enzima Flavourzyme

Ensaio	pH	[E] (mg g ⁻¹)	[S] (mg mL ⁻¹)	%GH	%NR
1	-1	-1	-1	25,4	71,4
2	1	-1	-1	14,3	94,8
3	-1	1	-1	28,0	97,4
4	1	1	-1	30,0	72,9
5	-1	-1	1	22,3	70,0
6	1	-1	1	22,3	65,8
7	-1	1	1	19,5	80,8
8	1	1	1	21,8	79,0
9	-1,68	0	0	26,8	77,8
10	1,68	0	0	25,4	82,1
11	0	-1,68	0	19,8	63,4
12	0	1,68	0	24,7	88,1
13	0	0	-1,68	23,8	82,3
14	0	0	1,68	19,8	79,2
15	0	0	0	21,9	75,0
16	0	0	0	24,1	83,7
17	0	0	0	23,2	78,3

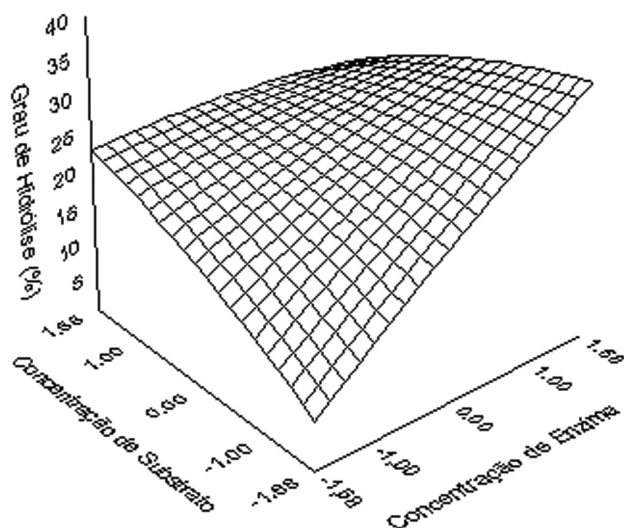


Figura 2. Superfície de resposta do efeito combinado da concentração da enzima Flavourzyme e da concentração do substrato no pH ótimo de 7,5 em função do grau de hidrólise

vezes maior que o tabelado (2,22).

Para o hidrolisado enzimático de cabrinha a partir da Flavourzyme foi observado pH ótimo de 7,5, trabalhando melhor em temperatura mais branda (50 °C), o que pode ser explicado por sua baixa resistência ao calor e à quantidade utilizada de enzima, que foi de 3% (p p⁻¹), enquanto que com a Alcalase foi utilizado 0,5% (p p⁻¹). Cândido e Sgarbieri,¹⁰ após testarem diferentes preparados enzimáticos (Alcalase, Flavourzyme e Esperase), escolheram a Flavourzyme devido às seguintes características: baixo pH ótimo (7,0), produz hidrolisados com sabor agradável (menos amargor); é menos termo-resistente, favorecendo a inativação ao final do processo de hidrólise

e necessita menor quantidade de enzima para obtenção do mesmo grau de hidrólise.²⁸

Os resultados podem ser comparados com os obtidos por Nilsang *et al.*,⁹ que estudaram a hidrólise a partir da enzima Flavourzyme, mas hidrolisando um concentrado protéico de pescado e concluíram que a Flavourzyme mostrou hidrólise eficiente, com condições ótimas de 50 LAPU_{enzima} g⁻¹ proteína, 6 h de reação a 45 °C. Para o hidrolisado enzimático de cabrinha a concentração da enzima que se mostrou melhor foi a 30 mg g⁻¹ pescado, a concentração do substrato foi de 500 mg mL⁻¹ de tampão em pH 7,5 e reação por 2 h a 50 °C. Os parâmetros utilizados para a análise foram diferentes, mas concordam quando avaliam que a Flavourzyme é uma enzima que precisa de tempo maior para atingir o grau de hidrólise desejado e que trabalha a temperaturas mais brandas que a Alcalase.

CONCLUSÃO

Para Alcalase as variáveis que obtiveram maior efeito no processo de hidrólise foram temperatura, pH e concentração do substrato, enquanto que para Flavourzyme foram pH, concentração da enzima e concentração do substrato.

A espécie que se mostrou mais apropriada ao processo de hidrólise foi a cabrinha, obtendo maiores valores de grau de hidrólise utilizando tanto Alcalase como Flavourzyme, aumentando em aproximadamente 1,9% o grau de hidrólise, quando comparada à corvina.

O maior grau de hidrólise obtido para a enzima Alcalase foi de 34,7%; sendo este ensaio realizado a 70 °C, pH 7,5, concentração do substrato de 500 mg mL⁻¹ a 0,5% (p p⁻¹) de enzima, com a cabrinha durante 1 h de reação. O hidrolisado que obteve maior nitrogênio recuperado (88,5%) ocorreu nas mesmas condições, onde foi obtido o maior grau de hidrólise.

O maior grau de hidrólise para a reação com Flavourzyme ocorreu a 50 °C, pH 7,5, concentração do substrato de 500 mg mL⁻¹, concentração da enzima de 3% (p p⁻¹), com a cabrinha durante 2 h de reação, apresentando grau de hidrólise final de 30%. A reação que obteve a maior quantidade de nitrogênio recuperado (97,4%) foi a que ocorreu a 50 °C, pH 6,5, concentração do substrato de 50 mg mL⁻¹, concentração da enzima de 3% (p p⁻¹), utilizando a cabrinha durante 2 h de reação.

O estudo realizado mostra que é possível produzir hidrolisados protéicos enzimáticos, com resultados satisfatórios de grau de hidrólise e nitrogênio recuperado, a partir de pescados de baixo valor comercial.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento do projeto e à CAPES pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

- Slizyte, R.; Dauksas, E.; Falch, E.; Storro, I.; Rustad, T.; *Process Biochem.* **2005a**, *40*, 1424.
- Kristinsson, H. G.; Rasco, B. A.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2000a**, *40*, 81.
- Shahidi, F.; Han, X. Q.; Synowiecki, J.; *Food Chem.* **1995**, *53*, 293.
- Onodenalora, A. C.; Shahidi, F.; *J. Aquat. Food Prod. Technol.* **1996**, *5*, 59.
- Guerard, F.; Guimas, L.; Binet, A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *19-20*, 498.
- Linder, M.; Fanni, J.; Parmentier, M.; Sergent, M.; Phan-Than-Lu, R.; *J. Food Sci.* **1995**, *60*, 952.
- AOAC; *Official Methods of Analysis of International*, 16th ed., USA,

- 1995.
8. Diniz, F. M.; Martin, A. M.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **1996**, 31, 426.
9. Nilsang, S.; Lertsiri, S.; Suphantharika, M.; Assavanig, A.; *J. Food Eng.* **2005**, 70, 578.
10. Cândido, L. M. B.; Sgarbieri, V. C.; *J. Sci. Food Agric.* **2003**, 83, 944.
11. Gildberg, A.; Arnesen, J. A.; Carlehög, M.; *Process Biochem.* **2002**, 38, 480.
12. Benjakul, B.; Morrissey, M. T.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 3430.
13. Baek, H. H.; Cadwallader, K. R.; *J. Food Sci.* **1995**, 60, 935.
14. Hoyle, N.; Merritt, J. H.; *J. Food Sci.* **1994**, 59, 79.
15. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; *J. Biopl. Chem.* **1951**, 193, 275.
16. Liceaga-Gesualdo, A. M.; Li-Chan, E. C. Y.; *J. Food Sci.* **1999**, 64, 1004.
17. Maldonado, A. S.; *Bol. Inv. Ins. Tec. Pes. Peru* **1994**, 4, 14.
18. Contreras-Guzmán, E. S.; *Bioquímica de Pescados e Derivados*, FUNEP: São Paulo, 1994.
19. Martin, R. E.; Flick, G. J.; Hebard, C. E.; Ward, D. D.; *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*, AVI Publishing Company: Westport, 1982.
20. Moraes, C.; Montovani, D. M. B.; Carvalho, C. R. L.; *Col. Inst. Tecnol. Alim.* **1992**, 22, 72.
21. Kristinsson, H. G.; Rasco, B. A.; *Process Biochem.* **2000b**, 36, 139.
22. Slizyte, R.; Dauksas, E.; Falch, E.; Storro, I.; Rustad, T.; *Process Biochem.* **2005b**, 40, 2033.
23. Aspino, S. I.; Horn, S. J.; Eijssink, V. G. H.; *Process Biochem.* **2005**, 40, 1966.
24. Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; *Como Fazer Experimentos*, Ed. UNICAMP: São Paulo, 2003.
25. Kalil, S. J.; Maugeri, F.; Rodrigues, M. I.; *Process Biochem.* **2000**, 35, 550.
26. Márquez, M. C.; Vázquez, M. A.; *Process Biochem.* **1999**, 35, 117.
27. Liasset, B.; Nortvedt, R.; Lied, E.; Espe, M.; *Process Biochem.* **2002**, 37, 1269.
28. Vioque, J.; Sanchez-Vioque, R.; Clemente, A.; Pedroche, J.; Bautiste, J.; Millan, F.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1999**, 76, 823.