

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA E DE SUBSTRATO NO GRAU DE HIDRÓLISE E NAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE CORVINA (*Micropogonias furnieri*)

Graciela Salet Centenaro*, Carlos Prentice-Hernández e Myriam Salas-Mellado

Escola da Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, CP 474, 96201-900 Rio Grande – RS, Brasil

Flavia Maria Netto

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, CP 6121, 13083-862 Campinas – SP, Brasil

Recebido em 19/8/08; aceito em 7/4/09; publicado na web em 26/8/09

EFFECT OF SUBSTRATE AND ENZYME CONCENTRATIONS ON THE HYDROLYSIS DEGREE AND IN THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF PROTEIN HYDROLYSATES OF WHITEMOUTH CROAKER (*Micropogonias furnieri*). The objective of this work was to obtain hydrolysates with different degrees of hydrolysis using Alcalase 2.4L[®] and to evaluate the effect of the enzyme [E] and substrate [S] concentration on the functional properties of the hydrolysates. It was obtained hydrolysates with hydrolysis degree values ranging from 12.2 to 43.7%. The values of solubility and water holding capacity were similar for the greater number of the hydrolysates with minimum values in the pH 5.0. The hydrolysis degree showed direct relationship with the solubility and indirect with the water holding capacity, oil holding capacity, emulsifying capacity and foaming capacity.

Keywords: whitemouth croaker; degree of hydrolysis; functional properties.

INTRODUÇÃO

A proteína de origem animal tem sido o foco para o desenvolvimento de tecnologias que permitam seu melhor aproveitamento devido à sua qualidade nutricional. Nesse sentido, os concentrados protéicos, a silagem enzimática, os isolados e hidrolisados proteicos de pescado surgem como tecnologias promissoras. Alguns subprodutos do processamento de pescado são espécies de baixo valor comercial destinadas, na sua maioria, para fabricação de farinha de pescado juntamente com os demais resíduos da indústria, ou então são descartados no meio ambiente. Para que sejam desenvolvidos processos para utilizar estas espécies, é necessário que os mesmos sejam viáveis, caso contrário serão descartadas.^{1,2}

A corvina (*Micropogonias furnieri*) é considerada, devido a sua abundância, uma das mais tradicionais e importantes espécies da pesca brasileira, argentina e uruguaia.³ No entanto, apesar de sua grande disponibilidade, atinge no mercado menores preços em relação a outras espécies regionais, principalmente as de menor tamanho.⁴

A aplicação de tecnologia enzimática para a transformação da carne de pescado em uma nova fonte proteica é um método alternativo para o melhor aproveitamento de espécies sem valor comercial, a fim de recuperar e modificar as proteínas para a produção de diversos ingredientes alimentícios e produtos de uso industrial.⁵ Para que esses produtos possam ser aplicados com êxito, é necessário conhecer as propriedades funcionais, que estão diretamente relacionadas com as características sensoriais e de textura dos alimentos. O conhecimento das propriedades funcionais específicas dos hidrolisados tende a facilitar o direcionamento da sua aplicação, contribuindo para um melhor aproveitamento, resultando em produtos de maior qualidade tecnológica e nutricional.^{1,6}

A Alcalase, uma enzima alcalina produzida a partir do *Bacillus licheniformis* e desenvolvida para a indústria de detergentes, tem sido frequentemente utilizada por muitos pesquisadores os quais constataram ser uma das melhores enzimas para a obtenção de hidrolisados proteicos com propriedades funcionais.^{1,6}

O conhecimento da relação do grau de hidrólise com alguma característica funcional específica do hidrolisado permite elaborar produtos com propriedades funcionais previamente definidas, que podem ser usados como ingredientes alimentícios.^{7,8} Diversos trabalhos têm demonstrado que a hidrólise enzimática de proteína de arenque,^{9,10} tubarão,¹¹ salmão,^{1,12,13} capelin,¹⁴ sardinha,^{15,16} soro de leite¹⁷ e proteína de soja^{18,19} melhora as suas propriedades funcionais. Certas propriedades funcionais de hidrolisados proteicos exercem um papel predominante, pois irão determinar as características principais do produto final, definindo seu uso. Logo, a origem da proteína a ser utilizada como matéria-prima para produzir hidrolisados proteicos, assim como o grau de hidrólise obtido devem ser controlados em função das principais propriedades funcionais que se deseja explorar.

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da [E] e da [S] no grau de hidrólise enzimática e nas propriedades funcionais de hidrolisados proteicos obtidos a partir de corvina, uma espécie de baixo valor comercial, utilizando a enzima Alcalase.

PARTE EXPERIMENTAL

Matéria-prima e reagentes

A corvina foi doada pela Indústria Pescal S.A., localizada na cidade de Rio Grande - RS. A matéria-prima foi transportada em recipiente com gelo até o Laboratório de Tecnologia de Alimentos da FURG. Os filés limpos foram acondicionados em embalagens de polietileno após evisceração e filetagem e armazenados sob congelamento em temperatura de -18 °C. A enzima proteolítica utilizada foi a Alcalase 2.4L[®], fornecida pela Novozymes Latin América Ltda. Os reagentes químicos utilizados durante o processamento assim como nas análises químicas foram todos de qualidade analítica (P.A).

Determinação da composição proximal dos filés e dos hidrolisados

Os filés foram descongelados em refrigerador por 14 h, homogeneizados em triturador de facas duplas (Arno, modelo PL, *pic-liq*) e caracterizados quimicamente. A composição proximal dos filés de corvina e dos hidrolisados foi determinada de acordo com a meto-

*e-mail: gracentenaro@yahoo.com.br

dologia oficial da AOAC,²⁰ onde proteínas foram determinadas pelo método de Kjeldahl (Nx6,25), lipídios pelo método de Soxhlet, cinza por método gravimétrico em mufla 550-600 °C e umidade por método gravimétrico em estufa a 105 °C.

Preparação dos hidrolisados proteicos de corvina (HPC)

Foram realizados experimentos em reator encamisado (1 L) mediante agitação de 600 rpm com agitador eixo-hélice, conforme Gbogouri *et al.*,¹² a uma temperatura de 50 °C, por 60 min. O pH foi ajustado utilizando tampão fosfato 0,1 M pH 8,0. Tomaram-se amostras no final da reação para a medida do grau de hidrólise de cada ensaio. Após o término da reação, a enzima foi inativada termicamente a 85 °C por 15 min. Os HPC inativados foram desidratados em estufa com circulação forçada de ar (modelo Q314M, Quimis) em temperatura de 60 °C por 10 h. Os HPC secos foram moídos em triturador de facas duplas (Arno, modelo PL *pic-liq*), peneirados e acondicionados em recipientes herméticos em temperatura de refrigeração.

Determinação do grau de hidrólise (GH)

A reação de hidrólise foi interrompida com adição de solução de ácido tricloroacético (TCA 6,25%) conforme Pezoa e Salas-Mellado,²¹ Tomaram-se 6 mL de amostra e adicionaram-se 4 mL de TCA (6,25%). Após repouso de 15 min a amostra foi filtrada em papel filtro (Whatman, nº 1) e o teor de proteínas solúveis foi determinado no filtrado pelo método de Lowry *et al.*,²² expressando a concentração de proteínas como mg de albumina, através de leitura em espectrofotômetro visível (Biospectro, modelo SP-22) à absorbância de 750 nm. Para tal, foi necessária a construção de uma curva padrão de albumina. O grau de hidrólise foi expresso como a relação entre as proteínas solubilizadas e as proteínas totais presentes no substrato inicial em %, de acordo com a Equação 1.

$$\% \text{ GH} = \frac{\text{proteína hidrolisada (solubilizada em TCA 2,5\%)} (\text{mg}) \times 100}{\text{proteína total (mg)}} \quad (1)$$

Solubilidade (S)

A solubilidade (S) dos HPC foi determinada de acordo com o método descrito por Morr *et al.*²³ com variação de pH na faixa de 3 a 11. Os teores de proteína total na reação e proteína solúvel no sobrenadante foram determinados pelo método de Kjeldahl, (N x 6,25) e pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com Lowry *et al.*,²² respectivamente. A S da proteína foi calculada como a relação entre a proteína no sobrenadante e a proteína total x 100, conforme a Equação 2.

$$\%S = \frac{A \times 50 \times 100}{W \times P} \quad (2)$$

onde: A = Concentração de proteína no sobrenadante (mg/mL); W = Peso da amostra (mg); P = Quantidade de proteína total.

Capacidade de retenção de água (CRA)

A CRA dos HPC foi medida segundo o método de Regenstein *et al.*,²⁴ adaptado às condições do laboratório. Foram preparadas dispersões protéicas (1%), com variação de pH na faixa de 3 a 11. Adicionou-se 2 mL de solução de NaCl 0,1 M. O pH foi ajustado com solução tampão de acordo com o pH correspondente até o volume de 40 mL. A dispersão foi mantida sob agitação por 15 min e centrifu-

gado a 3000 x g por 25 min. As proteínas solúveis no sobrenadante foram quantificadas pelo método de Lowry *et al.*²² e descontadas do total de proteínas da amostra original. A capacidade de retenção de água foi determinada como a quantidade de água retida pela proteína contida na amostra, expressa em g de água retida por grama de proteína, de acordo com a Equação 3.

$$\text{CRA} = \frac{\text{quantidade de água retida (g)} \times 100}{\text{massa proteína original (g)}} \quad (3)$$

Capacidade de retenção de óleo (CRO)

A CRO dos HPC foi determinada segundo metodologia descrita por Fonkwe e Singh,²⁵ adaptada às condições do laboratório. A diferença entre o óleo adicionado e o óleo não retido foi considerada como a quantidade de óleo retido pelos hidrolisados. A CRO foi expressa como a quantidade de óleo retido por grama de proteína presente no hidrolisado, de acordo com a Equação 4.

$$\text{CRO} = \frac{\text{óleo retido (mL)}}{\text{massa proteína (g)}} \quad (4)$$

Capacidade emulsificante (CE)

A CE dos HPC foi determinada pelo método descrito por Okezie e Bello,²⁶ O volume de óleo separado em cada amostra, após a centrifugação, foi medido diretamente no tubo. A diferença entre a camada de óleo remanescente e a quantidade de óleo adicionado foi expressa como a quantidade de óleo emulsificado e retido, por grama de proteína contida na amostra. A CE foi calculada de acordo com a Equação 5.

$$\text{CE} = \frac{\text{quantidade de óleo emulsificado (mL)}}{\text{massa proteína (g)}} \quad (5)$$

Capacidade de formação de espuma (CFE) e estabilidade de espuma (EEs)

A CFE foi medida de acordo com um método combinado, apresentado por Phillips *et al.*²⁷ e Dipack e Kumar,²⁸ onde se preparou uma suspensão de 5 g de amostra com 100 mL de água. A suspensão foi agitada em liquidificador doméstico (Arno, modelo LIR-P), por 5 min, transferindo-se a dispersão para uma proveta graduada de 500 mL. A capacidade de formação de espuma foi calculada como a % de aumento de volume baseando-se no volume inicial e após a formação de espuma, conforme a Equação 6.

$$\text{CFE} = \frac{(B-A)}{A} \times 100 \quad (6)$$

onde: A = volume antes da agitação (mL); B = volume após batimento (mL).

A determinação da estabilidade de espuma (EEs) dos HPC foi medida através do repouso da amostra à temperatura ambiente (20-25 °C), com leitura do volume após intervalos de 1, 5, 10, 30 e 60 min, sendo a estabilidade calculada pela Equação 7,

$$\text{EEs} = \frac{V}{V_0} \times 100 \quad (7)$$

sendo que V é o volume final de espuma, após cada intervalo de tempo, e V₀ corresponde ao volume inicial da espuma formada (mL).

Todas as medidas dos valores das propriedades funcionais foram realizadas em triplicata.

Planejamento experimental

Foi empregado um planejamento fatorial completo 2², com duas variáveis independentes estudadas em dois níveis, três repetições no ponto central, totalizando onze ensaios, segundo Barros Neto *et al.*²⁹ A Tabela 1 mostra os níveis para cada variável independente estudada e a Tabela 2 apresenta a matriz do planejamento.

Tabela 1. Valores das variáveis independentes e seus respectivos níveis codificados e reais

Variáveis	níveis				
	- α	-1	0	+1	+ α
[S] (p/v)	2,18	3	5	7	7,82
[E] (p/p)	0,0318	0,04	0,06	0,08	0,0882

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial completo (2²) para a hidrólise enzimática de corvina, utilizando Alcalase ($\alpha = \pm 1,41$)

Ensaio*	Variáveis codificadas e reais		Resposta
	[E]	[S]	%GH
1	-1 (0,04)	-1 (3)	14,0 \pm 0,75
2	+1 (0,08)	-1 (3)	40,6 \pm 0,89
3	-1(0,04)	+1 (7)	19,8 \pm 0,21
4	+1 (0,08)	+1 (7)	30,8 \pm 0,84
5	- α (0,0318)	0 (5)	15,7 \pm 0,26
6	+ α (0,0882)	0 (5)	37,7 \pm 0,79
7	0 (0,06)	- α (2,18)	12,2 \pm 0,11
8	0 (0,06)	+ α (7,82)	43,7 \pm 0,33
9	0 (0,06)	0 (5)	15,0 \pm 0,45
10	0 (0,06)	0 (5)	15,3 \pm 0,28
11	0 (0,06)	0 (5)	15,1 \pm 0,25

*Experimentos realizados em ordem aleatória.

Como resposta, avaliou-se o grau de hidrólise (GH), e as seguintes propriedades funcionais: solubilidade (S), capacidade de retenção de água (CRA), capacidade de retenção de óleo (CRO), capacidade emulsificante (CE) e capacidade de formação de espuma (CFE). As variáveis independentes foram: concentração de substrato [S], sendo considerada a quantidade de proteína do substrato em relação ao volume de tampão (p/v) expresso como porcentagem e a concentração de enzima [E], considerando a massa de enzima em relação à massa em proteína presente no substrato, expresso em porcentagem (p/p).

Tabela 3. ANOVA para GH, CRA (pH 7,0 e 9,0) e CFE

	GH*	CRA (pH3)*	CRA (pH5)**	CRA (pH7)**	CRA (pH9)***	CRA (pH11)**	CRO*	CFE*	CE**
F _{cal}	3,80	4,93	3,08	14,28	9,50	3,05	2,87	17,84	4,6
F _{tab}	5,05	3,18	5,05	3,45	2,68	3,07	4,53	5,05	3,03
F _{cal} /F _{tab}	0,75	1,55	0,61	4,14	3,54	0,99	0,63	3,53	1,51
R ²	0,79	0,76	0,75	0,93	0,90	0,78	0,65	0,94	0,66

Significativos à: * p<(0,05), ** (p<0,10), *** (p<0,20).

A análise estatística dos resultados permitiu determinar os efeitos significativos e ajustar empiricamente modelos matemáticos relacionando as variáveis e as respostas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Grau de hidrólise

Os valores de GH para os HPC mostrados na Tabela 2 apresentaram uma variação de 12,2 a 43,7% nos ensaios 7 e 8, respectivamente. Na menor e maior concentração de substrato empregada, obteve-se a menor e a maior resposta mostrando que esta variável exerce uma grande influência no GH, assim como verificado por Baek e Cadwallader,³⁰ que através da hidrólise de subprodutos de crustáceos obtiveram maior grau de hidrólise em maiores concentrações de substrato. Do contrário, quando são empregadas concentrações maiores que 8% no sistema, sem considerar a enzima, a concentração de substrato poderá apresentar um efeito inibidor na recuperação das proteínas.¹ De acordo com Kristinsson e Rasco,¹ aumentando a concentração de proteases há aumento do grau de hidrólise, como verificado neste trabalho, porém os custos em função da utilização de maiores quantidades de enzima poderão ser elevados. Considerando somente os efeitos significativos, realizou-se a ANOVA das variáveis dependentes (Tabela 3) e verificou-se que o GH não apresentou modelo preditivo visto que F calculado não foi suficientemente superior (3 vezes maior) que o F tabelado.

Solubilidade

Pôde-se verificar que a hidrólise enzimática contribuiu para aumentar a solubilidade dos HPC comparados com o músculo *in natura*, como pode ser observado através das curvas de solubilidade (Figura 1) obtidas em diferentes valores de pH. A solubilidade é uma das propriedades funcionais mais importantes das proteínas e dos hidrolisados proteicos. Muitas das outras propriedades funcionais, como emulsificação e propriedades espumantes, são afetadas pela solubilidade.¹⁰ Para Sathivel *et al.*¹³ a hidrólise enzimática leva a uma maior exposição de grupos carregados, diminui o tamanho molecular e aumenta a hidrofobicidade das proteínas, através de um aumento na habilidade de formar ligações de hidrogênio com a água e, conseqüentemente, aumenta a solubilidade.

Os resultados mostraram que as curvas de solubilidade para todos os HPC, apresentaram o menor valor no pH 5,0, pois este pH se encontra próximo ao ponto isoelétrico das proteínas, onde o número de cargas negativas e positivas tende a se neutralizar intramolecularmente, apresentando uma menor afinidade pela água. Verificou-se que houve um pequeno aumento dessa propriedade no valor de pH ácido, e um aumento progressivo do pH neutro para os pHs alcalinos, sendo que os maiores valores de solubilidade foram obtidos no pH 11,0. Conforme Sgarbieri,³¹ as proteínas miofibrilares podem estar formando complexos insolúveis e somente a predominância de cargas negativas em pHs fortemente alcalinos gera forças de repulsão

eletrostática capazes de promover a dissociação dos complexos e solubilização. Comparando o músculo *in natura* de corvina com os HPC, o mesmo apresentou valores de solubilidade inferiores. Estes resultados concordam com Rebeca *et al.*,³² pois segundo estes autores as proteínas miofibrilares do pescado são muito insolúveis devido ao maior tamanho das moléculas, comparadas às dos hidrolisados. Também foi estudada a relação entre solubilidade e GH. Os hidrolisados com maior GH mostraram maior solubilidade que os hidrolisados com menores valores de GH, concordando com os resultados obtidos por Gbogouri *et al.*,¹² os quais verificaram que para o menor GH encontrado (11,5%) em hidrolisados de cabeça de salmão, os valores de solubilidade variaram de 75 a 85% aproximadamente, em diferentes valores de pH. Para o maior valor de GH obtido pelos autores (17,3%), os valores de solubilidade foram também maiores variando de 85 a 95% para diferentes valores de pH.

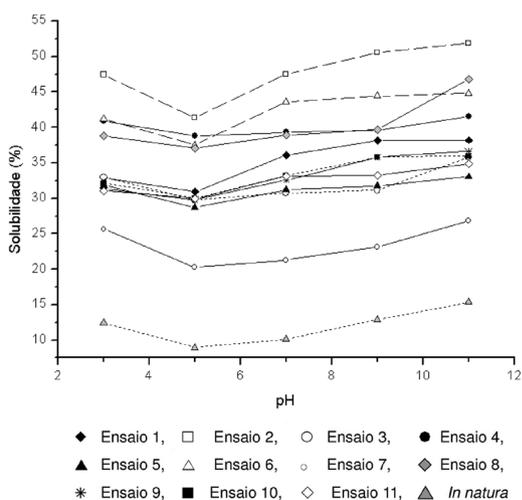


Figura 1. Curvas de solubilidade dos HPC e do músculo *in natura* em diferentes valores de pH

Segundo Panyam e Kilara,³³ uma das principais consequências da hidrólise enzimática é o aumento da solubilidade e, normalmente, este aumento está associado ao aumento do grau de hidrólise. O aumento da solubilidade dos hidrolisados deve-se à diminuição do tamanho das moléculas e consequente aumento da exposição de grupos hidrofílicos amino e carboxil ionizáveis. O HPC obtido a partir das condições do ensaio 2 foi o que apresentou os maiores valores de solubilidade em todos os pHs e, também, um dos maiores valores de GH (40,64%) obtidos neste estudo. O mesmo foi observado para os ensaios 4, 6 e 8 que apresentaram, respectivamente, valores de GH de 30,8; 37,7 e 43,7%. O hidrolisado do ensaio 7 apresentou a menor solubilidade em todos os valores de pH, sendo este fato justificado pelo baixo GH apresentado por esse produto (12,8%). Os HPC obtidos através dos ensaios dos pontos centrais 9, 10 e 11 apresentaram perfis de solubilidade semelhantes aos hidrolisados 1, 3 e 5, bem como aos seus valores de GH. Através da ANOVA, observou-se que para a solubilidade nenhum modelo foi preditivo.

Capacidade de retenção de água (CRA)

Observou-se que para todos os HPC, o menor valor de CRA foi obtido no pH 5,0, que coincide com a solubilidade mínima dos hidrolisados (Figura 3). Os hidrolisados mais solúveis apresentaram valores menores de CRA, ou seja, a CRA diminuiu com o aumento do GH. O mesmo efeito foi constatado por Roman e Sgarbieri,³⁴ trabalhando com hidrólise enzimática de caseína bovina. Eles ve-

rificaram que os hidrolisados com GH 12,8; 20,1 e 35,8% tiveram valores de CRA significativamente inferiores quando comparados ao hidrolisado com GH 5,7% e com a caseína não hidrolisada. Na Figura 2 observa-se também que a capacidade de reter água diminuiu com o aumento do grau de hidrólise. Os HPC com GH de 43,7; 40,6 e 37,7% (ensaios 8, 2 e 6, respectivamente) apresentaram valores de CRA inferiores quando comparados ao hidrolisado com GH 12,18% (ensaio 7).

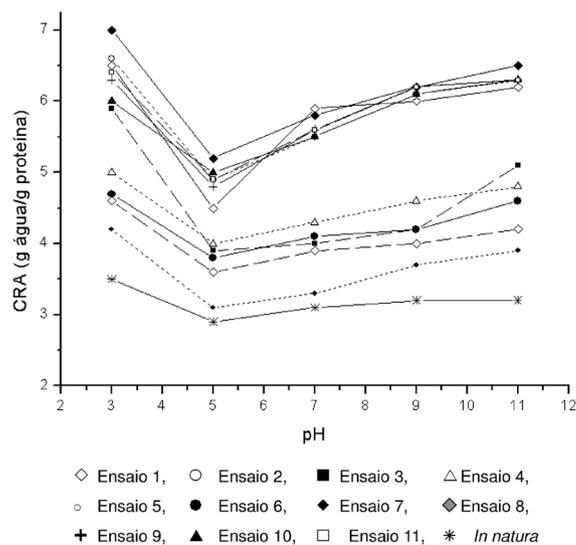


Figura 2. Curvas de capacidade de retenção de água dos HPC e do músculo *in natura*

Segundo Kinsella,³⁵ a quantidade de água associada à proteína depende de uma série de fatores, destacando-se a sua composição, conformação, número de grupos polares expostos, presença de sais e pH. A CRA depende particularmente do tamanho molecular e da capacidade de formação de uma rede proteica. Os hidrolisados com maior GH e, portanto, menor peso molecular, não podem formar essa rede, pois apresentam uma maior concentração de grupos hidrofóbicos e um menor tamanho molecular.³⁴ O músculo *in natura* apresentou o menor valor de CRA em todos os valores de pH pois as proteínas nativas têm menos capacidade de absorver água que as proteínas desnaturadas, porque a alta hidrofobicidade da superfície da proteína desnaturada promove a formação de uma matriz proteica capaz de reter determinada quantidade de água em sua estrutura.³⁶ A partir da ANOVA dos resultados encontrados, foi possível verificar que somente a CRA, nos valores de pH 7,0 e 9,0, apresentou modelos significativos e preditivos. Na Tabela 3 pode ser observada a ANOVA da CRA medida em pH 7,0 e 9,0. O modelo com as variáveis codificadas que representa a CRA em pH 7,0 em função das concentrações de enzima e de substrato, na faixa estudada, está representado pela Equação 8 e a superfície de resposta correspondente pode ser observada na Figura 3.

$$CRA_{(pH 7.0)} = 5,56 - 0,46[E] - 0,42[E]^2 - 0,629[S] - 0,548[S]^2 - 0,575[E].[S] \quad (8)$$

Verifica-se que (Figura 3) com uma concentração de enzima de 0,04%, utilizando uma concentração de substrato em torno de 3%, se pode obter um valor máximo para CRA medida em pH 7,0, de aproximadamente 6 g água/g proteína nas condições da reação. O modelo com as variáveis codificadas, que representa a CRA em pH 9,0 em função da concentração de enzima e concentração de substrato, na faixa estudada está representado pela Equação 9. A superfície de resposta gerada pelo modelo pode ser observada na Figura 4, onde

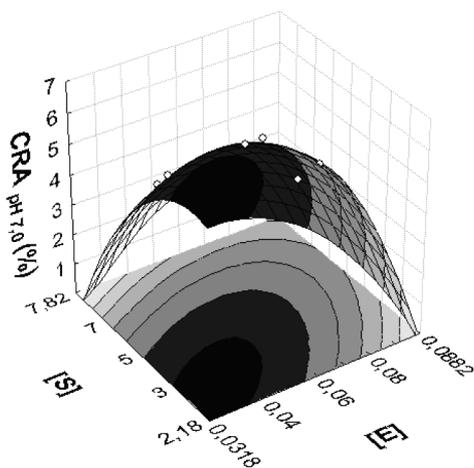


Figura 3. Superfície de resposta representando a CRA em pH 7,0 em função da concentração de enzima e de substrato

é possível verificar que com uma concentração de enzima entre 0,04 e 0,05%, utilizando uma concentração de substrato entre 3 e 4%, pode-se obter um valor de CRA máximo, por volta de 6 g água/g proteína, medida um pH de 9,0 nas condições de reação da Alcalase.

$$CRA_{(pH\ 9,0)} = 6,168 - 0,53[E] - 0,598[E]^2 - 0,592[S] - 0,698[S]^2 - 0,600[E].[S] \quad (9)$$

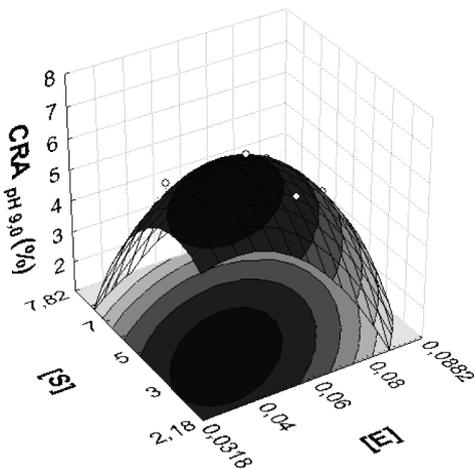


Figura 4. Superfície de resposta representando a CRA em pH 9,0 dos HPC em função da concentração de enzima e de substrato

Capacidade de retenção de óleo (CRO)

Observa-se que o músculo *in natura* apresentou maior CRO quando comparado aos HPC (Figura 5), sendo este resultado também observado por Gbogouri *et al.*¹² onde a proteína nativa de salmão apresentou maiores valores de CRO (10,67 mL óleo/g proteína) comparado com os hidrolisados produzidos por estes autores. A proteína é capaz de formar uma rede que é degradada através da hidrólise, diminuindo consequentemente a capacidade de absorção de óleo da amostra.³⁷ O resultado é uma baixa hidrofobicidade dos hidrolisados proteicos, pois quando proteínas apresentam grandes quantidades de regiões hidrofóbicas, há favorecimento de sua interação com o óleo, explicando porque a CRO do músculo foi maior que a dos HPC.³⁸

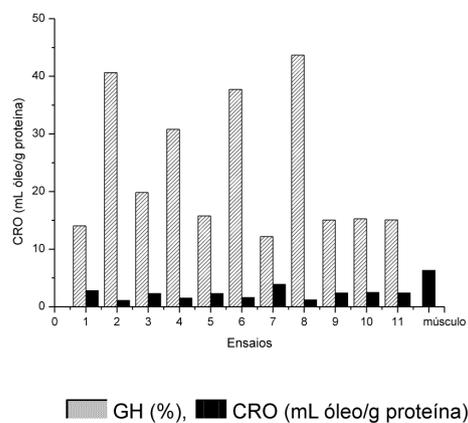


Figura 5. Capacidade de retenção de óleo e GH dos HPC e do músculo *in natura*

Notou-se que os hidrolisados com valores de GH baixos apresentaram valores de CRO altos comparando todos os HPC. Os hidrolisados obtidos nas condições dos ensaios 7 e 8, que tiveram o menor e o maior valor de GH (12,2 e 43,7%, respectivamente), apresentaram o maior e o menor valor de CRO (3,9 e 1,2 mL óleo/g proteína) respectivamente. Estes resultados concordam com estudos de Gbogouri *et al.*,¹² Kristinson,² e Sathivel *et al.*,¹³ onde os autores verificaram que a CRO foi menor nos hidrolisados que apresentaram GH maiores. Através da ANOVA, observou-se que a concentração de enzima [E] apresentou um efeito significativo e negativo nos valores de CRO dos hidrolisados, mostrando que, quando a concentração de enzima do meio aumentou de 0,04 para 0,08%, houve uma diminuição de 1,25% nessa propriedade.

A concentração de substrato [S] não mostrou um efeito significativo sobre a CRO neste estudo. A interação entre as variáveis [E] e [S] foi significativa para o processo e influenciou positivamente a CRO dos hidrolisados, no entanto, para esta propriedade funcional não foi possível obter modelo preditivo, como pode ser observado na Tabela 3.

Capacidade emulsificante (CE)

O músculo *in natura* apresentou o maior valor para a CE (18,8 mL óleo/g proteína) e o maior valor desta propriedade para os hidrolisados foi obtido no ensaio 7 (12,9 mL óleo/g proteína) que, por sua vez, apresentou o menor valor de GH, como pode ser observado na Figura 6. De acordo com Panyam e Kilara,³³ a hidrólise extensiva das proteínas resulta em uma drástica perda das propriedades emulsificantes, sendo que estas diminuem linearmente com o grau de hidrólise. Peptídeos maiores promovem maior estabilidade da emulsão, ao passo que a presença de peptídeos menores prejudica a formação e a estabilidade das emulsões. As propriedades emulsificantes das proteínas também dependem da solubilidade inicial. Quanto mais dissolvida a proteína estiver no sistema da emulsão, mais efetiva poderá ser a interface entre a fase óleo e a fase contínua durante a emulsificação. No entanto, a formação de um filme interfacial coesivo e elástico por adsorção de moléculas de proteína na interface poderá ser dificultada pela predominância de pequenos peptídeos. Esta pode ser uma razão da diminuição da capacidade de emulsificação dos hidrolisados à medida que aumenta o grau de hidrólise.^{33,39} Após a ANOVA dos valores de CE obtidos para os HPC, verificou-se que para esta propriedade não foi possível obter modelos matemáticos preditivos.

Capacidade de formação de espuma (CFE)

Os resultados de CFE dos hidrolisados e do músculo apresentaram diferença significativa ($\alpha=0,05$) entre si, onde se pode observar que o músculo de corvina *in natura* apresentou o maior valor para

esta propriedade. Os maiores valores de CFE entre os hidrolisados foram obtidos pelos ensaios 7 (38%), 1 (35%), 5 (32%), 9 (30%), 10 (30%) e 11 (28%).

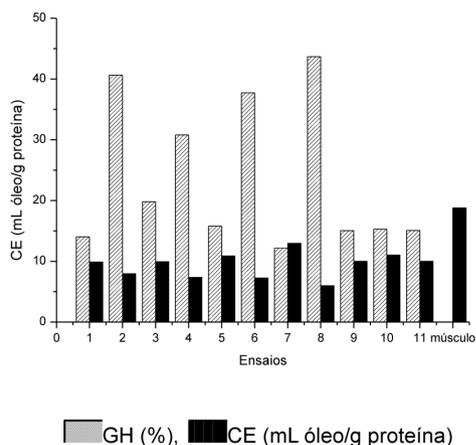


Figura 6. Capacidade emulsificante e GH dos hidrolisados de corvina e do músculo *in natura*

Observa-se que a maior expansão de espuma, entre os HPC, foi conseguida com o hidrolisado do ensaio 7 que apresentou um valor baixo de GH. Souissi *et al.*³⁹ também observaram que a CFE diminui com o aumento do GH. O ensaio 6 resultou no hidrolisado com a menor CFE, seguido dos ensaios 2, 4 e 8, sendo que os mesmos apresentam os maiores valores de GH, concordando com Roman e Sgarbieri,³⁴ os quais relataram que, apesar dos pequenos peptídeos se difundirem rapidamente na interface e serem adsorvidos, eles são menos eficientes na redução da tensão superficial, pela dificuldade de se reorientarem na interface água-ar e formarem uma membrana contínua viscoelástica, dificultando a formação de espuma. Segundo Kinsella,³⁵ o ideal para que uma proteína apresente o melhor desempenho na formação e estabilidade de espuma, é que possua um peso molecular maior que 20 Kda, um mínimo de carga líquida, presença de sítios de ligações hidrofóbicas, além de uma conformação flexível. Para o autor, não somente fatores relacionados ao GH podem influir no desempenho das propriedades de espuma, mas também o pH e outros aspectos relacionados à composição dos hidrolisados. Neste estudo, a CFE aumentou com a diminuição do GH dos hidrolisados.

Estabilidade de espuma (EEs)

Observou-se uma boa estabilidade de espuma para todos os hidrolisados. Após 60 min a EEs apresentou uma leve diminuição para os ensaios 2, 4, 6 e 8, os quais apresentaram os maiores valores de GH confirmando a mesma relação de GH com a CFE. Tanto a CFE como a EEs mostraram uma relação negativa com o GH, confirmando o efeito do tamanho molecular dos peptídeos com as propriedades espumantes.¹⁴ Porém, a influência do GH sobre a CFE foi muito maior do que sobre a EEs. A análise de variância ($\alpha=0,05$) dos valores de EEs entre os tempos de 5 e 60 min mostrou que não houve diferença significativa somente para o hidrolisado 7 e para o músculo *in natura*. Todos os outros hidrolisados apresentaram diferença significativa nos valores de EEs do tempo de 5 para o tempo de 60 min. O hidrolisado 7 apresentou maior produção de espuma e com maior estabilidade. Observa-se que o valor de F calculado (Tabela 3) foi suficientemente maior que o F tabelado, confirmando a preditividade do modelo. O modelo com as variáveis codificadas que representa a CFE, em função da [E] e [S] na faixa estudada, está

representado pela Equação 10. A superfície de resposta que permite a visualização do comportamento dos HPC, em função das variáveis que apresentaram influência significativa sobre a variável resposta CFE está demonstrada na Figura 7.

$$CFE (\%) = 29,347 - 10,21 [E] - 6,57 [E]^2 - 7,20 [S] - 3,55 [S]^2 + 2,50 [E].[S] \quad (10)$$

Analisando a Figura 7 é possível verificar que com uma concentração de enzima 0,04%, utilizando uma concentração de substrato até 3%, pode-se obter uma CFE máxima, nas condições de pH 8,0 a uma temperatura de 50 °C por um tempo de reação de 60 min.

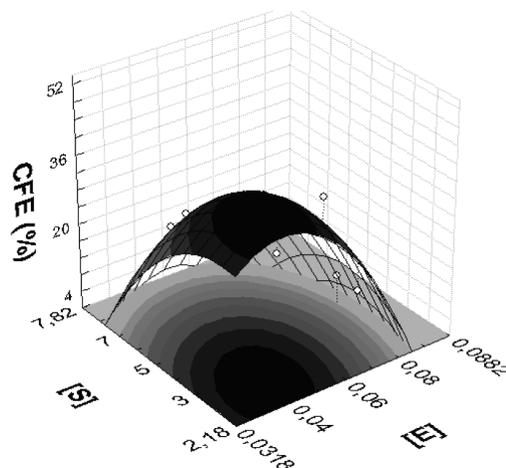


Figura 7. Superfície de resposta representando a CFE dos HPC em função da concentração de enzima e de substrato

Apesar dos processos biológicos que utilizam enzimas serem de custo operacional maior, os mesmos são mais promissores quando se deseja produtos com alta funcionalidade e valor nutritivo. Além disso, observou-se com este estudo que utilizando espécies de pescado de baixo valor comercial e uma baixa concentração de enzima, podem ser produzidos hidrolisados com propriedades funcionais satisfatórias, os quais poderiam ser utilizados para elaborar produtos com maior valor agregado.

CONCLUSÃO

Foi possível obter hidrolisados enzimáticos de corvina com diferentes valores de GH utilizando enzima comercial Alcalase 2.4L. Verificou-se que as propriedades funcionais de hidrolisados protéicos de pescado podem ser modificadas de acordo com o a extensão da hidrólise. Neste estudo o GH mostrou uma relação positiva com a CRA, CRO, CE e CFE. A análise estatística dos resultados experimentais permitiu a obtenção de modelos matemáticos relacionando a [E] e a [S] com a CFE e com a CRA em pH 7,0 e 9,0. Portanto, a produção de hidrolisados com diferentes GH e diferentes propriedades funcionais, pode ser disponibilizada para diversas finalidades tecnológicas em formulações alimentícias de acordo com as características do produto desejado.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa concedida e a Indústria Pescal S.A. pela doação da matéria-prima.

REFERÊNCIAS

1. Kristinsson, H. G.; Rasco, B. A.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2000**, *40*, 43.
2. Kristinsson, H. G.; Rasco, B. A.; *Process Biochem.* **2000**, *36*, 131.

3. Borges, A.; Teixeira, M. S.; Freitas, M. Q.; Franco, R. M.; Mársico, E. T.; São Clemente, S. C.; *Ciênc. Rural* **2007**, *37*, 259.
4. Bonacina, M.; Queiroz, M. I.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2007**, *27*, 544.
5. Mullally, M. M.; O'Callaghan, D. M.; Fitzgerald, R. J.; Donnelly, W. J.; Dalton, J. P.; *J. Food Sci.* **1995**, *60*, 227.
6. Benjakul, S.; Morrissey, M.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3423.
7. Aspmo, S. I. Horn, S. J. Eijnsink, V. G. H.; *Process Biochem.* **2005**, *40*, 1957.
8. Shahidi, F.; Kamil, Y. V. A. J.; *Trends Food Sci. Technol.* **2001**, *12*, 435.
9. Liceaga-Gesualdo, A. M., Li-Chan, E. C. Y.; *J. Food Sci.* **1999**, *64*, 1000.
10. Sathivel, S.; Bechtel, P.; Babbitt, J.; Smiley, S.; Crapro, C.; Reppond, K.; *J. Food Sci.* **2003**, *68*, 2196.
11. Diniz, F. M.; Martin, A. M.; *LWT- Food Sci. Technol.* **1997**, *30*, 266.
12. Gbogouri, G.A.; Linder, M.; Fanni, J.; Parmentier, M.; *Food Chem. Toxicol.* **2004**, *69*, 615.
13. Sathivel, S.; Smiley, S.; Prinyawiwatkul, W.; Bechtel, P. J.; *J. Food Sci.* **2005**, *70*, 401.
14. Shahidi, F.; Han, X. Q.; Synowiecki, J.; *Food Chem.* **1995**, *53*, 285.
15. Quaglia, G. B.; Orban, E.; *J. Sci. Food Agric.* **1987**, *38*, 271.
16. Quaglia, G. B.; Orban, E.; *J. Food Sci.* **1990**, *55*, 1571.
17. Sinha, R.; Radha, C.; Prakash, J.; Kaul, P.; *Food Chem.* **2007**, *101*, 1484.
18. Don, B. L. S.; Pilosof, A. M. R.; Bartholomai, G. B.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1991**, *68*, 102.
19. Jung, S.; Murphy, P. A.; Johnson, L. A.; *J. Food Sci.* **2005**, *70*, 180.
20. AOAC; *Official Methods of Analysis*, 16th ed., Arlington, 1995.
21. Pezoa, V. G.; Mellado, M. S.; *Obtenção de um concentrado de proteínas de pescado para alimentos pelo método enzimático*, FURG: Rio Grande, 1979.
22. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265.
23. Morr, V.; German, B.; Kinsella, J. E.; Regenstein, J. M.; Van Buren, J. P.; Kilara, A.; Lewis, B. A.; Mangina, M. E.; *J. Food Sci.* **1985**, *50*, 1715.
24. Regenstein, J. M.; Gorimar, T. S.; Sherbon, J. M.; *J. Food Biochem.* **1979**, *3*, 205.
25. Fonkwe, L. G.; Singh, R. K.; *Process Biochem.* **1996**, *31*, 605.
26. Okezie, B. O.; Bello, A. B.; *J. Food Sci.* **1988**, *53*, 540.
27. Phillips, L. G.; Haque, Z.; Kinsella, J. E.; *J. Food Sci.* **1987**, *52*, 1074.
28. Dipack, K.; Kumar, K. D.; *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 775.
29. Barros Neto, B. B.; Scarmínio, I. S.; Bruns, R. E.; *Planejamento e Otimização de Experimentos*, 2^a ed., Editora da Unicamp: São Paulo 1996.
30. Baek, H. H.; Cadwallader, K.R.; *J. Food Sci.* **1995**, *60*, 929.
31. Sgarbieri, V.C.; *Boletim da SBCT* **1998**, *32*, 105.
32. Rebeca, B. D.; Peña-Vera, M. T.; Díaz-Castañeda, M.; *J. Food Sci.* **1991**, *56*, 309.
33. Panyam, D., Kilara, A.; *Trends Food Sci. Technol.* **1996**, *7*, 120.
34. Roman, J. A.; Sgarbieri, V. C.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2005**, *25*, 468.
35. Kinsella, J. E.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1984**, *21*, 197.
36. Sgarbieri, V. C.; *Proteínas em alimentos protéicos. Propriedades – Degradações – Modificações*, 1^a ed., Livraria Varela: SP, 1996.
37. Wasswa, J.; Tang, J.; Gu, X. H.; Yuan, X. Q.; *Food Chem.* **2007**, *104*, 1698.
38. Cheftel, J. C.; Cuq, J. L.; Lorient, D. Em *Food Chemistry*; Fennema, O. R., ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1985, p. 245-369.
39. Souissi, N.; Bougatef, A.; Triki-ellou, Y.; Nasri, M.; *Food Technol. Biotechnol.* **2007**, *45*, 191.