

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ CENTRO DE
ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
“STRICTO SENSU” EM RECURSOS PESQUEIROS E ENGENHARIA DE PESCA –
NÍVEL DE DOUTORADO

**PRODUÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO DE PEIXE A PARTIR DE
APARAS DE FILÉ DE *Oreochromis niloticus***

JOANA KARIN FINKLER

TOLEDO – PR - BRASIL

Março de 2024

JOANA KARIN FINKLER

**PRODUÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO DE PEIXE A PARTIR DE
APARAS DE FILÉ DE *Oreochromis niloticus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, área de concentração em Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr. Pitágoras Augusto Piana

Co-Orientadora: Prof. Dr. Wilson Rogério Boscolo

TOLEDO – PR - BRASIL

Março de 2024

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Finkler, Joana Karin

Produção de hidrolisado proteico de peixe a partir de
aparas de filé de *Oreochromis niloticus* / Joana Karin
Finkler; orientadora Pitágoras Augusto Piana; coorientadora
Wilson Rogerio Boscolo. -- Toledo, 2024.

69 p.

Tese (Doutorado Campus de Toledo) -- Universidade Estadual
do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas,
Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia
de Pesca, 2024.

1. Processamento de pescado. 2. Otimização. 3. Hidrólise
enzimática. 4. Propriedades funcionais. I. Piana, Pitágoras
Augusto, orient. II. Boscolo, Wilson Rogerio, coorient. III.
Título.

O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”.

Aristóteles

Sumário

Sumário	5
Lista de Figuras	6
Lista de Tabelas	8
Nomenclatura.....	9
Resumo Geral	10
OVERVIEW	11
Capítulo 1 - Revisão bibliográfica	12
1. Produção mundial da aquicultura	12
2. Proteínas do pescado	13
3. Coprodutos da indústria pesqueira.....	14
4. Hidrolisados proteicos de pescado	15
5. Propriedades funcionais.....	18
6. Distribuição dos Pesos Moleculares dos Hidrolisados Proteicos de Peixe.....	20
7. Considerações finais.....	20
8. Referências bibliográficas	21
Capítulo 2 – Artigo 1.....	23
Capítulo 3 – artigo 2	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma da produção de hidrolisado proteico de peixe.	16
Figura 2- Superfície de resposta gerado para o GH do HPP obtido utilizando Alcalase [®] (a), Neutrase [®] (b) e Novo-Pro D [®] (c). As linhas tracejadas indicam pontos estacionários.	35
Figura 3 - Da esquerda para a direita, reator experimental e banho termostático e agitador mecânico.	48
Figura 4 - Amostra colhida durante o ensaio de cinética da hidrólise enzimática.	49
Figura 5 - <i>Spray Dryer</i> utilizado para realização da secagem dos HPPs.	51
Figura 6 - Aqualab CX-2 T Braseq.	54
Figura 7 - Colorímetro portátil Konica Minolta Sensing.	54
Figura 8 - Cinética do processo de hidrólise dos HPP's elaborados a partir de aparas do filé de <i>Oreochromis niloticus</i> com as enzimas Alcalase 2.4 L [®] (A), Neutrase [®] (N) e Novo-Pro D [®] (P).	56
Figura 9 - Solubilidade dos HPP's elaborados a partir de aparas do filé de <i>Oreochromis niloticus</i> com as enzimas Alcalase 2.4 L [®] (A), Neutrase [®] (N), Novo-Pro D [®] (P) e matéria prima (MP).	57
Figura 10 - Absorção de Água (CA _{água}) e Capacidade de Absorção de Óleo (CA _{óleo}) dos HPP's elaborados a partir de aparas do filé de <i>Oreochromis niloticus</i> com as enzimas Alcalase 2.4 L [®] (A), Neutrase [®] (N) e Novo-Pro D [®] (P).	58
Figura 11 - Higroscopicidade e Atividade de Água (Aw) dos HPP's elaborados a partir de aparas do filé de <i>Oreochromis niloticus</i> com as enzimas Alcalase 2.4 L [®] (A), Neutrase [®] (N) e Novo-Pro D [®] (P).	60
Figura 12 - Perfil de cores dos HPP's elaborados a partir de aparas do filé de <i>Oreochromis niloticus</i> com as enzimas Alcalase 2.4 L [®] (A), Neutrase [®] (N) e Novo-Pro D [®] (P).	61
Figura 13 - Espectros FTIR dos HPP's elaborados a partir de aparas do filé de <i>Oreochromis niloticus</i> com as enzimas Alcalase 2.4 L [®] (A), Neutrase [®] (N) , Novo-Pro D [®] (P) e matéria prima (MP).	63

Figura 14 - Curvas de DCS dos HPP's elaborados a partir de aparas do filé de <i>Oreochromis niloticus</i> com as enzimas Alcalase 2.4 L [®] (A), Neutrase [®] (N), Novo-Pro D [®] (P) e matéria prima (MP).....	64
Figura 15 - Distribuição de peso molecular dos HPP's. Faixa 1: controle, faixa 2: matéria prima (2.000 rpm), faixa 3: matéria prima (10.000 rpm), faixa 4: Alcalase 2.4 L [®] em 1 h, faixa 5: Neutrase [®] em 3 h e faixa 6: Novo-Pro D [®] em 2 h.	65
Figura 16 - CCD. 1: Alcalase [®] , 5000 rpm; 2: Neutrase [®] , 5000 rpm; 3: Novo-Pro D [®] , 3000 rpm; 4: Novo-Pro D [®] , 5000 rpm; 5: Matéria prima, 3.000 rpm; 6: Matéria prima 5.000 rpm; 7: Padrão tirosina e glicina 2mg/500 microlitros; 8: Padrão BSA 1mg/ml (66.43 g/mol).	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção mundial de pescado, utilização e tendências.....	12
Tabela 3 - Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no DCCR 22 para hidrólise de aparas do filé de tilápia-do-Nilo com emprego das enzimas Alcalase [®] , Neutrase [®] e Novo-Pro D [®] : temperatura (T, °C), concentração enzimática (E, %) e pH.....	31
Tabela 4 - Grau de hidrólise (GH) do hidrolisado proteico de aparas de filé de tilápia do Nilo em testes de temperatura (T), concentração enzimática (E) e pH, utilizando as enzimas Alcalase [®] , Neutrase [®] e Novo-Pro D [®]	32
Tabela 5 - Estatísticas do modelo de superfície de resposta de segunda ordem (SO(x1, x2)) aplicado para otimização do grau de hidrólise em hidrolisado protéico de peixe (HPP) utilizando as enzimas Alcalase [®] , Neutrase [®] e Novo Pro-D [®]	33
Tabela 6 - Conteúdo de minerais dos HPPs elaborados a partir de aparas do filé de <i>Oreochromis niloticus</i> com as enzimas Alcalase 2.4 L [®] , Neutrase [®] e NovoPro D [®]	62

NOMENCLATURA

A_w – Atividade de água

$CA_{\text{água}}$ – Capacidade de Absorção de água

$CA_{\text{óleo}}$ - Capacidade de Absorção de óleo

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

DSC – Calorimetria diferencial de varredura

FT-IR – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

GH – Grau de Hidrólise

HPP – Hidrolisado Proteico de Peixe

PS – Proteína Solúvel

TXRF - Fluorescência de Raios X por Reflexão Total

RESUMO GERAL

Os hidrolisados proteicos de peixe (HPPs) obtidos por meio de hidrólise enzimática destacam-se como alternativa para recuperação de proteína e obtenção de produtos de alto valor biológico. O objetivo do presente estudo otimizar a produção e caracterizar os hidrolisados proteicos de peixe elaborados a partir de hidrólise enzimática de aparas de filé de *Oreochromis niloticus*, utilizando três diferentes enzimas: Alcalase®, Neutrase® e Novo-Pro D®. Para isso, aplicou-se um Planejamento Fatorial Fracionado (PFF) 23-3 para selecionar as variáveis mais influentes no processo, seguido de DCCR. A partir dos parâmetros de pH, concentração da enzima e temperatura otimizadas para cada enzima, foram produzidos HPPs com o máximo grau de hidrólise, os quais foram analisados quanto à cinética do processo de hidrólise, as propriedades funcionais, solubilidade, capacidade de absorção de água e de óleo, higroscopicidade, atividade de água e cor, o conteúdo de minerais, por meio de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF), a composição química, através da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), a estabilidade térmica, por meio da calorimetria diferencial de varredura e a distribuição do peso molecular, através da cromatografia de camada delgada (CCD) e eletroforese. O grau máximo estimado de hidrólise (GHmax) usando Alcalase 2.4L® foi de 60,05% em 180 min a 39,03°C e 0,65% de enzima, enquanto a Neutrase® atingiu GHmax de 56,96% em 120 min a 39,46°C e pH 6,039 e a Novo-Pro® D teve GHmax de 54,76% em 60 min a 47,95°C e 0,866% de enzima. Os HPPs elaborados com Alcalase 2.4 L® e Novo-Pro D® demonstraram melhores resultados na cinética do processo de hidrólise, com a última se destacando em relação à velocidade inicial da reação. A análise de composição química comprovou a degradação da proteína em fragmentos menores e aminoácidos livres. A distribuição do peso molecular dos compostos revela o alto conteúdo de aminoácidos livres e proteínas de baixo peso molecular em todos os HPPs. Os HPPs elaborados com as enzimas Alcalase 2.4 L®, Neutrase® e Novo-Pro D® apresentaram características satisfatórias em relação a propriedades funcionais, conteúdo de minerais, estabilidade térmica e distribuição do peso molecular. Todos os HPPs demonstraram potencial para a utilização na indústria de alimentos, seja como alimento funcional ou como ingrediente de alto valor biológico para formulações especiais.

Palavras-chave: enzima, protease, aminoácido, peptídeo, proteína, propriedades funcionais, otimização

OVERVIEW

Fish protein hydrolysates (FPHs) obtained through enzymatic hydrolysis stand out as an alternative for protein recovery and obtaining products of high biological value. The objective of the present study is to improve the production and characterize fish protein hydrolysates prepared from enzymatic hydrolysis of *Oreochromis niloticus* fillet trimmings, using three different enzymes: Alcalase®, Neutrase® and Novo-Pro D®. For this, a 2^{3-3} Fractional Factorial Planning (FFP) was applied to select the most influential variables in the process, followed by the DCCR. Using the optimized pH, enzyme concentration and temperature parameters for each enzyme, HPPs with the maximum degree of hydrolysis were produced, which were analyzed for the kinetics of the hydrolysis process, such as functional properties, solubility, comprehensibility of water and oil, hygroscopicity, water activity and color, mineral content, through total reflection X-ray fluorescence (TXRF), chemical composition, through Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), thermal stability, through differential scanning calorimetry and molecular weight distribution, through thin layer chromatography (TLC) and electrophoresis. The estimated maximum degree of hydrolysis (DHmax) using Alcalase 2.4L® was 60.05% in 180 min at 39.03°C and 0.65% enzyme, while Neutrase® achieved a DHmax of 56.96% in 120 min at 39.46°C and pH 6.039 and Novo-Pro® D had a DHmax of 54.76% in 60 min at 47.95°C and 0.866% enzyme. The FPHs made with Alcalase 2.4 L® and Novo-Pro D® obtained results in the kinetics of the hydrolysis process, with the latter standing out in relation to the initial speed of evidence. Chemical composition analysis confirmed the manipulation of the protein into fragments and free amino acids. The molecular weight distribution of the compounds reveals the high content of free amino acids and low molecular weight proteins in all HPPs. The FPHs made with the enzymes Alcalase 2.4 L®, Neutrase® and Novo-Pro D® showed satisfactory characteristics in relation to functional properties, mineral content, thermal stability and molecular weight distribution. All FPHs demonstrated potential for use in the food industry, either as functional food or as an ingredient of high biological value for special formulations.

Keywords: enzyme, protease, amino acid, peptide, protein, functional properties, optimization

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Produção mundial da aquicultura

A aquicultura, junto com a pesca vem ocupando cada vez mais um lugar de destaque com contribuição essencial para garantir a segurança alimentar e nutricional da população global (FAO, 2022). Além do crescimento populacional, as recentes mudanças no estilo de vida das pessoas em escala mundial trouxeram consigo novas demandas no âmbito socioeconômico e tecnológico que refletem também na alimentação, cujo principal objetivo deixou de ser apenas o fornecimento de nutrientes essenciais para a manutenção da vida e passou a voltar-se para a busca por maiores benefícios à saúde (Tadesse et al., 2023).

Em 2020, foram produzidas 178 milhões de toneladas de animais aquáticos ao redor do mundo, sendo 88 milhões de toneladas provenientes somente da aquicultura, o que corresponde a 49% do total (FAO, 2022). Da produção total de pescados, 37% advêm de animais originários de águas continentais, sendo 83% destes provenientes da aquicultura (FAO, 2022). A Tabela 1 mostra um resumo da produção mundial de pescado e a evolução das formas de consumo.

Tabela 1 - Produção mundial de pescado, utilização e tendências.

Ano	População (Bi)	Consumo <i>per capita</i> (kg)	Produção de pescado	Consumo humano	Consumo não humano
2010	7,3	19,5	162,6	143,2	19,3
2018	7,6	20,5	178,9	156,8	22,2
2020	7,8	20,2	177,8	157,4	20,4

A tabela acima mostra que com o aumento da população e a redução da produção mundial de pescado, a tendência foi de redução do consumo per capita pela pressão da oferta escassa versus crescente demanda.

No Brasil, a espécie mais produzida é a tilápia do Nilo, sendo o país o quarto maior produtor da espécie. Foram 550.060 toneladas produzidas em 2022, de um total de 860.355 toneladas de peixes produzido pela aquicultura no mesmo ano. Este volume representa 63,93% da produção de todo o país e demonstrou um aumento de 3% em relação ao ano de 2021 (Medeiros, 2023)

2. Proteínas do pescado

Grande parte dos peixes destinados ao consumo humano passa por algum tipo de processamento prévio, onde as partes consideradas comestíveis são separadas das partes supostamente não comestíveis ou de baixo valor comercial. Entretanto, Raghavan (2008) aponta que esses coprodutos muitas vezes subutilizados apresentam um conteúdo elevado de proteína de alto valor biológico, chegando até 10 – 20% do conteúdo total de proteína do peixe.

As proteínas dos peixes são constituídas por três grupos: proteínas sarcoplasmáticas, proteínas miofibrilares e estromáticas. As proteínas sarcoplasmáticas são aquelas que estão presentes no sarcoplasma, representando cerca de 15 a 35% das proteínas do pescado, a depender da espécie (Ogawa, 1999). Estas proteínas são solúveis em água e correspondem aos compostos que conferem cor, odor e sabor característicos do pescado. Por serem solúveis em água, são as primeiras a serem perdidas nos processos de degradação e descongelamento. Entre as proteínas sarcoplasmáticas, estão a creatina quinase, aldolase e enzimas relacionadas ao metabolismo da energia celular, além de pigmentos como mioglobina e hemoglobina (Korkmaz et al., 2021).

As proteínas miofibrilares consistem em componentes estruturais dos músculos dos peixes. A actina e a miosina, responsáveis pelas contrações musculares são as representantes deste grupo que corresponde a 65-75% de toda a proteína dos peixes. A miosina, que está presente em maior proporção, é composta por duas cadeias pesadas (223 kDa) e duas cadeias leves (22 e 18 kDa) (Ogawa, 1999).

O colágeno e a elastina pertencem ao grupo das proteínas estromáticas, que constituem o tecido conjuntivo e fazem parte da pele, escamas e músculos, representando cerca de 3% do total das proteínas dos peixes (Korkmaz et al., 2021). Esse grupo contém em sua composição glicina apolar, valina, alanina, prolina e hidroxiprolina, sendo rico em aminoácidos.

As proteínas são formadas por longas cadeias de peptídeos, que por sua vez são constituídas por peptídeos menores e estes, por aminoácidos. Os aminoácidos são compostos orgânicos formados por uma cadeia carbônica ligada a um grupo amina e um grupo carboxila, contendo ainda um radical R que confere diferentes propriedades ao aminoácido (Lehninger et al., 1995). O tamanho das cadeias

peptídicas, seu perfil de aminoácidos e suas terminações vão influenciar nas propriedades das proteínas, desde nutricionais, funcionais e organoléticas até tecnológicas.

3. Coprodutos da indústria pesqueira

Das 178 milhões de toneladas de pescados produzidas em 2020, 157 milhões, ou 89% foram utilizados como alimento humano, enquanto 11% foram em sua maioria utilizados na fabricação de farinha e óleo de peixe, correspondendo a mais de 17 milhões de toneladas (FAO, 2022).

Essa matéria prima subutilizada é considerada uma valiosa fonte de proteína de alto valor biológico e aminoácidos essenciais. Entre os coprodutos da indústria de processamento de peixes estão cabeças, carcaças, peles, escamas, vísceras, espinhos, sangue e refis. A maior parte desse material é destinado para a fabricação de produtos de menor valor comercial, como farinha e óleo de peixe, ambos empregados principalmente na formulação de rações para a piscicultura e para a indústria pet. Desta forma, fica evidente a necessidade de valorização destes coprodutos. Nesse contexto, é possível aplicar o conceito da economia circular à indústria de alimentos, que prioriza a conversão destas matérias primas subutilizadas em produtos de valor agregado (Souza et al., 2021)

Os coprodutos da indústria pesqueira são fontes de aminoácidos essenciais, colágeno, ácidos graxos poli insaturados e enzimas. De acordo com Sila & Bougatef (2016), o teor de proteína bruta dos subprodutos de pescado varia de 8 a 35%.

Atualmente, o maior desafio da indústria para otimizar o aproveitamento da matéria prima para o consumo humano com a recuperação da proteína de coprodutos é a definição de técnicas e parâmetros que permitam o controle de processos para obter produtos padronizados, em larga escala e com alta qualidade (Finkler, et al. 2022). Uma mobilização tem sido observada no meio científico em torno deste tema para atender à demanda gerada (Mora, & Reig, 2016; Mullen et al., 2017; Amiza et al. 2017; Mora & Toldrá, 2023; Tadesse et al., 2023; Zhang et al., 2023).

Dentre as técnicas mais promissoras para a recuperação de proteínas de coprodutos alimentares estão os processos biotecnológicos como fermentação e

hidrólise enzimática, que conservam suas propriedades nutricionais, funcionais, organoléticas e tecnológicas (Korkmaz et al., 2021).

4. Hidrolisados proteicos de pescado

Os HPPs obtidos por meio de hidrólise enzimática são reconhecidos como uma abordagem eficaz e sustentável para agregar valor aos coprodutos da indústria de processamento de pescado (Borges et al., 2023; Naghdi et al., 2023). Os coprodutos do processamento de peixes submetidos à hidrólise por peptidases resultam em compostos constituídos de peptídeos relativamente pequenos, com 2 a 20 aminoácidos (Gao et al., 2021). Além disso, apresentam custo de produção relativamente baixo, elevado valor nutricional, propriedades funcionais adequadas à aplicação na indústria de alimentos e potencial para a obtenção de peptídeos com atividades biológicas específicas (Roslan et al. 2014b; Yarnpakdee et al. 2015; Amiza et al. 2017; Vaquéz et al. 2017).

O processo de recuperação de proteínas via hidrólise enzimática apresenta vantagens como a seletividade das enzimas aos substratos e a possibilidade de controle das condições do processo, como temperatura e pH, para obtenção de produtos com características e finalidades específicas (Amiza et al. 2012; Roslan et al. 2014b; Silva et al. 2014). Desta forma, todo o processo (Figura 1) pode ser desenvolvido sob condições amenas, garantindo a viabilidade técnica e econômica e a minimização de produtos indesejáveis, qualidade e alto rendimento do produto (Roslan et al. 2014b; Maluf et al, 2019).

As características finais dos hidrolisados proteicos são afetadas por vários fatores, como a proporção de enzima para substrato, temperatura, pH e tempo de hidrólise (Amiza et al. 2017; Vaquéz et al. 2017). Por isso, vários estudos vêm abordando a otimização de parâmetros para o processo de hidrólise enzimática de pescado (Finkler et al., 2022; Zhang et al., 2023; Wang et al., 2020).

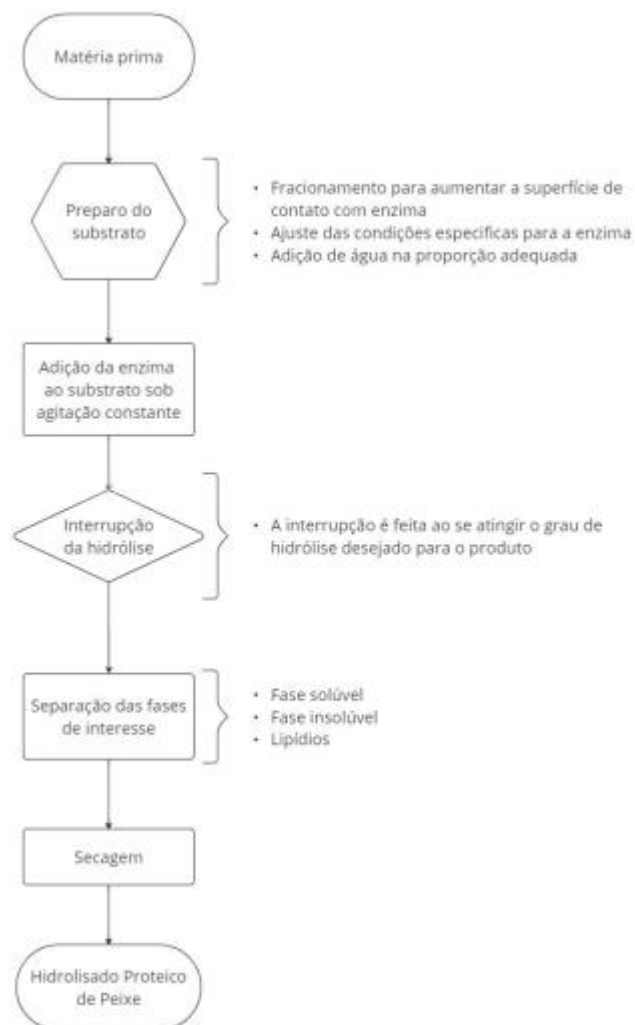


Figura 1- Fluxograma da produção de hidrolisado proteico de peixe.

A velocidade das reações de clivagem da proteína é diretamente influenciada pela temperatura. Além disso, interferem também nesse processo a energia de ativação da reação catalítica, a estabilidade térmica da enzima empregada, que varia de uma para outra, além da estabilidade térmica do substrato. A estabilidade térmica do substrato é influenciada pelo conteúdo e tamanho das moléculas da proteína, proporção entre proteínas sarcoplasmáticas, miofibrilares e estromáticas, comprimento das fibras musculares, entre outros fatores (Shen et al., 2012). Segundo os mesmos autores, o GH aumenta com a temperatura até atingir um valor ótimo, acima do qual o GH começa a diminuir. Isto ocorre porque temperaturas mais elevadas interrompem a força e quebram as ligações que mantêm a formatação da molécula da enzima, que é gradualmente desnaturada, o mesmo acontecendo com o substrato, que deixa de ser um sítio ativo para a enzima aos poucos. Enquanto em

temperaturas relativamente baixas, a taxa de reação enzimática é desacelerada, a energia cinética das moléculas diminui e as colisões entre elas são menos frequentes (Nelson & Cox, 2014). Uma temperatura muito baixa pode impedir que a energia de ativação da reação seja atingida para iniciar o processo. Assim, é crucial a determinação da temperatura ótima para a reação de hidrólise de cada substrato com uma enzima específica. O ótimo de temperatura para a atividade enzimática resulta da aceleração da reação com o incremento da temperatura até o ponto em que a molécula se mantém estável (Nelson & Cox, 2014; Whitaker & Dekker, 1994).

A eficiência da reação enzimática com o substrato também é afetada pela concentração da enzima. Via de regra, a velocidade da quebra das ligações peptídicas aumenta com o aumento da concentração da enzima. Apesar disso, o avanço do processo de hidrólise provoca a formação de compostos que competem por ligações em sítios ativos ou sítios alostéricos da enzima e do substrato, o que reduz a taxa de reação ao longo da hidrólise (Nelson & Cox, 2014). Por outro lado, com o avanço da hidrólise, ocorre a redução do substrato pelas quebras sucessivas, aumentando a probabilidade de uma molécula inibidora se ligar à enzima (Nelson & Cox, 2014).

Tão importante quanto os fatores já mencionados, o pH também exerce forte influência sobre a eficiência da reação hidrolítica. De acordo com Whitaker (1994), este fator exerce influência sobre as interações hidrofóbicas e hidrofílicas dos sítios ativos das enzimas, o que pode reduzir a ação da enzima de maneira reversível ou até mesmo desnaturá-la de forma permanente. As condições elevadas ou reduzidas de pH causam diminuição na atividade da enzima, uma vez que o sítio ativo fica progressivamente distorcido, influenciando negativamente a função enzimática (Shen et al. 2012).

Estudos voltados para as aplicações dos HPPs vêm crescendo nos últimos anos, demonstrando um amplo potencial desses produtos. A princípio, a técnica de recuperação de proteína foi desenvolvida para redução dos custos da ração para aquicultura melhorar a digestão, absorção e utilização dos nutrientes pelos animais. No entanto, seu potencial como ingrediente para incrementar o valor nutricional das dietas como suplemento e impacto positivo no desenvolvimento e imunidade dos animais logo chamou a atenção para novos estudos, desta vez, em dietas para humanos (Gao et al., 2021).

Nesse et al. (2014) relatam que uma proteína obtida do hidrolisado proteico de salmão do Atlântico rica em aminoácidos e peptídeos curtos pode ser utilizada como suplemento seguro e eficiente para crianças desnutridas. Além disso, os HPPs que apresentam atividade antioxidante são uma alternativa para prolongar a vida útil de alimentos (Gao et al., 2021). De acordo com estudo realizado por Dekkers et al., (2011), filés de *Coryphaena hippurus* mergulhados em hidrolisado proteico de *Oreochromis niloticus* têm sua estabilidade e a vida útil prolongada pela inibição da oxidação lipídica.

O potencial dos hidrolisados vêm sendo demonstrado em estudos para aplicação como suplemento proteico, fonte de peptídeos bioativos com ação antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, neuroprotetora e anti-hipertensiva, o que comprova as vantagens do aproveitamento desses produtos pela indústria alimentícia farmacêutica e cosmética (Gao et al., 2021).

5. Propriedades funcionais

Para além do valor nutritivo, as características estruturais e funcionais das proteínas são pilares na formulação de alimentos. A importância dessas propriedades varia de acordo com a matéria-prima e a técnica de purificação utilizada (Yathisha et al., 2022).

A maioria das proteínas em sua forma natural não apresenta as funcionalidades e bioatividade desejadas para o desenvolvimento de produtos alimentares funcionais. Por isso, a modificação dessas proteínas para aprimorar suas propriedades é fundamental para a indústria.

O emprego dos HPPs como ingredientes alimentares e aditivos para aumentar atividades de emulsificação, formação de espuma ou dispersão de alimentos vem sendo apontado como vantajoso por diferentes estudos, demonstrando que este é um ingrediente multifuncional para emprego em formulações de alimentos processados (Dekkers, Ragha van, Halim, Yusof e Sarbon, 2016).

A funcionalidade de um ingrediente está relacionada com suas características físico-químicas mais relevantes que exercem grande influência nos

processos de elaboração, estocagem, qualidade e aceitação de um alimento (Chou & Morr, 1979)

A capacidade de absorção de água influencia diretamente na viabilidade da elaboração de produtos cárneos na indústria em termos de aceitabilidade e margem de lucro. A perda de água prejudica o rendimento e os atributos de qualidade dos produtos, enquanto valores de retenção de água satisfatórios ajudam a preservar a umidade dos produtos, melhorando sua suculência, impedindo a perda de água no processo de cozimento, em produtos de panificação e em alimentos viscosos como sopas (Chaud & Sgarbieri, 2006; Damoradan et al., 2010).

De acordo com Damoradan et al. (2010), uma das propriedades tecnológicas mais importantes de um ingrediente é sua capacidade de absorção de óleo, que determina se este desempenhará sua função satisfatoriamente em produtos cárneos. O incremento da capacidade de absorção de óleo dos ingredientes afeta positivamente a palatabilidade e retenção de sabor e é fundamental da formulação de produtos emulsionados, molhos e massas, por exemplo. O mecanismo de absorção de óleo é principalmente atribuído à hidrofobicidade das moléculas. Além disso, a capacidade de absorção de óleo tem grande importância na formulação de alimentos, podendo influenciar na ordem de adição dos ingredientes secos na mistura, além de ser usado para determinar os tempos de mistura utilizando uma distribuição uniforme do óleo ou gordura na mistura seca (Chaud & Sgarbieri, 2006).

Yathisha et al. (2022) descobriram que a solubilidade do hidrolisado proteico é influenciada por três fatores principais: tempo de hidrólise, grau de hidrólise e pH. Isso é importante para a indústria de alimentos, pois a solubilidade é um parâmetro que pode ser ajustado para atender às necessidades específicas de cada aplicação. Quanto maior o tempo e o grau de hidrólise, maior a solubilidade do hidrolisado em uma ampla faixa de pH. Isso ocorre porque a hidrólise quebra as proteínas em peptídeos menores e aminoácidos, que são mais solúveis em água.

O pH também influencia a solubilidade. A carga líquida das moléculas proteicas muda à medida que o pH se afasta do ponto isoelétrico (pI). Se o pH for muito baixo ou muito alto, as moléculas proteicas se repelem e podem se precipitar. A hidrofobicidade da superfície das moléculas proteicas também pode afetar a solubilidade. Se a superfície for muito hidrofóbica, as moléculas podem se agregar e

precipitar (Halim et al, 2016). Em resumo, a solubilidade do hidrolisado proteico é um parâmetro importante que pode ser ajustado pela indústria de alimentos para atender às suas necessidades.

6. Distribuição dos Pesos Moleculares dos Hidrolisados Proteicos de Peixe

Os HPPs são produtos obtidos pela quebra de proteínas de peixe por meio de processos enzimáticos ou químicos. Eles têm uma ampla gama de aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. A distribuição dos pesos moleculares das moléculas dos hidrolisados proteicos de peixe é um fator importante que influencia suas propriedades funcionais e aplicações Yathisha et al. (2022).

A distribuição dos pesos moleculares dos hidrolisados proteicos de peixe é influenciada por vários fatores, como o tipo de matéria prima, condições de processo de hidrólise e escolha da enzima. O tipo de matéria-prima influencia na distribuição dos pesos moleculares do produto hidrolisado pois as proteínas do peixe variam em tamanho e composição de aminoácidos. Ao mesmo tempo, as condições de hidrólise, como temperatura, pH e tempo de reação, afetam o grau de quebra das proteínas e, consequentemente, a distribuição dos pesos moleculares. Além disso, as enzimas utilizadas na hidrólise têm diferentes especificidades, o que altera o tamanho das moléculas dos hidrolisados (Kristinsson & Rasco, 2011).

Existem vários métodos para determinar a distribuição dos pesos moleculares dos hidrolisados proteicos de peixe, incluindo a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), cromatografia de exclusão por tamanho, cromatografia de camada delgada e espectroscopia de massa.

A distribuição dos pesos moleculares dos hidrolisados proteicos de peixe determina suas propriedades funcionais e aplicações. Hidrolisados com baixo peso molecular (< 10 kDa) são mais solúveis e têm melhor digestibilidade, sendo utilizados em bebidas nutritivas e suplementos alimentares. Hidrolisados com peso molecular intermediário (10-50 kDa) têm propriedades emulsificantes e espessantes, sendo utilizados em produtos cárneos, lácteos e de panificação. Hidrolisados com alto peso molecular (> 50 kDa) têm propriedades gelificantes e espessantes, sendo utilizados em produtos de confeitaria e sorvetes (Mendis, E., et al., 2017).

7. Considerações finais

Diante das informações apresentadas, pode-se considerar que os hidrolisados proteicos de peixe são fontes seguras de alimento de alto valor biológico e podem ser ricos em compostos com propriedades bioativas diversas. Além disso, estão aptos para as mais variadas aplicações na indústria de alimento devido às suas características funcionais que podem ser controladas de acordo com as condições do processo. Por fim, são amplamente reconhecidas as vantagens do processo de hidrólise para recuperação de proteína, tornando o desenvolvimento da cadeia do pescado economicamente mais viável. Entretanto, para dispor de todos estes benefícios, é preciso desenvolver e padronizar as técnicas de produção bem como caracterizar o produto final a fim de validar o processo industrial para obtenção de hidrolisados proteicos de peixe com diferentes matérias primas e enzimas.

8. Referências bibliográficas

BORGES, S.; ODILA, J.; VOSS, G.; MARTINS, R.; ROSA, A.; COUTO, J. A.; ALMEIDA, A.; PINTADO, M. (2023). Fish By-Products: A Source of Enzymes to Generate Circular Bioactive Hydrolysates. *Molecules*, 28(3), 1155. DOI: 10.3390/molecules28031155.

CHAUD, F. G.; SGARBIERI, V. C. (2006). Propriedades funcionais (tecnológicas) da parede celular de leveduras da fermentação alcoólica e das frações glicana, manana e glicoproteína. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 26(2): 369-379.

CHOU, D. H.; MORR, C. V. Protein water interactions and functional properties. *Journal of American Oil Chemists Society*, Champaign, v. 56, n. 1, p. 53a-62a, 1979.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. *Química de Alimentos de Fennema*. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DEKKERS, E., RAGHAVAN, S., KRISTINSSON, H. G., & MARSHALL, M. R. (2011). Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 124(2), 640–645.

GAO, R., YU, Q., SHEN, Y., CHU, Q., CHEN, G., FEN, S., YANG, M., YUAN, L., MCCLEMENTS, D. J., & SUN, Q. [3] (2021). Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. In *Trends in Food Science and*

Technology (Vol. 110, pp. 687–699). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.031>

HALIM, N. R. A., YUSOF, H. M., & SARBON, N. M. (2016). Functional and bioactive properties of fish protein hydrolsates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 24–33.

KRISTINSSON, H. G., & RASCO, B. A. (2011). Biochemical and functional properties of fish protein hydrolysates. *Food Reviews International*, 27(1): 37-57. DOI: 10.1080/88388606.2010.499842

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. (1995). *Princípios de Bioquímica*. 2. ed. São Paulo: Sarvier.

MENDIS, E., et al. (2017). A review on the techno-functional properties of protein hydrolysates from fish sources. *Food Chemistry*, 227: 477-493.

Naghdi, S.; Rezaei, M.; Tabarsa, M.; Abdollahi, M. (2023). Fish Protein Hydrolysate from Sulfated Polysaccharides Extraction Residue of Tuna Processing By-Products with Bioactive and Functional Properties. *Global Challeng.*, 7(4), 2200214. DOI: 10.1002/gch2.202200214.

KORKMAZ, K.; TOKUR, B.; UÇAR, Y. (2021). Production of fish protein hydrolyzate using enzymatic hydrolysis from fish processing wastes. *Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences*, 31(2), 502–513. DOI: 10.29133/yyutbd.831067

NESSE, K. O., NAGALAKSHMI, A., MARIMUTHU, P., SINGH, M., BHETARIYA, P. J., HO, M., et al. (2014). Safety evaluation of fish protein hydrolysate in malnourished children. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69(1), 1–6.

KUMORO, A. C., WARGHANI, D. H., KUSWORO, T. D., DJAENI, M., PING, T. C., & AZIS, Y. M. F. (2022). Fish protein concentrate for human consumption: A review of its preparation by solvent extraction methods and potential for food applications. In *Annals of Agricultural Sciences* (Vol. 67, Issue 1, pp. 42–59). Faculty of Agriculture, Ain-Shams University. DOI: 10.1016/j.aoas.2022.04.003

MEDEIROS, F. (2023). *Anuário Peixe BR da Piscicultura 2023*. São Paulo/SP – Brasil.

RAGHAVAN, S., & KRISTINSSON, H. G. (2008). Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolysates: A comparative study of five enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1434–1441.

SOUSA, P. M.; MOREIRA, M. J.; DE MOURA, A. P.; LIMA, R. C.; CUNHA, L. M. (2021). Consumer Perception of the Circular Economy Concept Applied to the Food Domain: An Exploratory Approach. *Sustainability*, 13(20), 11340. DOI: 10.3390/su132011340

WANG, X., YU, H., XING, R., LIU, S., CHEN, X., & LI, P. (2020). Optimization of Oyster (*Crassostrea talienwhanensis*) Protein Hydrolysates Using Response Surface Methodology. *Molecules*, 25(12). DOI: 10.3390/molecules25122844

YATHISHA, U. G., VAIDYA, S., & SHESHAPPA, M. B. (2022). Functional Properties of Protein Hydrolyzate from Ribbon Fish (*Lepturacanthus Savala*) as Prepared by Enzymatic hydrolysis. *International Journal of Food Properties*, 25(1), 187–203. DOI: 10.1080/10942912.2022.2027964

**Produção de hidrolisados de proteína de peixe a partir de aparas de filé de
*Oreochromis niloticus***

Production of fish protein hydrolysates from *Oreochromis niloticus* fillet trimmings

**Producción de hidrolizados de proteína de pescado a partir de recortes de filetes de
*Oreochromis niloticus***

Resumo

A otimização de processos é essencial para a viabilidade em larga escala na indústria alimentícia. Aqui, aplicamos a metodologia de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) seguido de análise de superfície de resposta para otimizar a produção de hidrolisado de proteína de peixe (HPP). O HPP foi obtido a partir de aparas de filé de tilápia submetidas ao processo de hidrólise utilizando as enzimas Alcalase 2.4L®, Neutrase® e Novo-Pro® D, sob condições controladas de temperatura, concentração de enzima e pH. Primeiramente, aplicamos um Planejamento Fatorial Fracionado (PFF) 2^{3-3} para selecionar as variáveis mais influentes no processo com cada enzima a ser aplicada no DCCR. A partir do PFF, selecionamos temperatura e concentração de enzima para Alcalase 2.4L® e Novo-Pro® D, temperatura e pH para Neutrase®. O grau máximo estimado de hidrólise (GHmax) usando Alcalase 2.4L® foi de 60,05% em 180 min de processo a 39,03°C e concentração de enzima de 0,65%. Neutrase® atingiu GHmax de 56,96% durante 120 min a 39,46°C e pH 6,039, enquanto Novo-Pro® D teve GHmax de 54,76% durante 60 min a 47,95°C e 0,866% de concentração de enzima. Assim, as três enzimas apresentaram resultados promissores para obtenção de HPP com alta GH a partir de aparas de filés de tilápia do Nilo.

Palavras-chave: Hidrólise enzimática; Otimização; Coprodutos de pescado; Proteína; Protease.

Abstract

Process optimization is essential for the large-scale viability of the food industry. Central composite rotational design (CCRD) followed by response surface analysis was used to optimize the production of fish protein hydrolysate (FHP). FHP was obtained from tilapia filet trimmings hydrolyzed subjected using Alcalase 2.4L®, Neutrase®, and Novo-Pro® D enzymes under temperature, enzyme concentration, and pH-controlled conditions. A 2^{3-3} full factorial design (FFD) was initially employed to select the most influential variables in the process (with each enzyme used in the CCRD). From the FFD, temperature and enzyme concentration for Alcalase 2.4L® and Novo-Pro® D, and temperature and pH for Neutrase® were selected. The estimated maximum degree of hydrolysis (GH_{max}) using Alcalase 2.4L® was 60.05% during 180 min of processing at 39.03°C and 0.65% enzyme concentration. A GH_{max} of 56.96% was reached using Neutrase® during 120 min at 39.46°C and 6.039 pH. Novo-Pro® D was associated with a GH_{max} of 54.76% during 60 min at 47.95°C and 0.866% enzyme concentration. The three enzymes showed promising results for obtaining FHP with high GH from Nile tilapia filet trimmings.

Keywords: Enzyme hydrolysis; Optimization; Fish co-products; Protein; Protease

Resumen

La optimización de procesos es esencial para la viabilidad a gran escala en la industria alimentaria. Aquí, aplicamos la metodología de diseño rotacional compuesto central (DRCC) seguida de un análisis de superficie de respuesta para optimizar la producción de hidrolizado de proteína de pescado (HPP). El HPP se obtuvo a partir de recortes de filete de tilapia sometidos al proceso de hidrólisis utilizando las enzimas Alcalase 2.4L®, Neutrase® y Novo-Pro® D, en condiciones controladas de temperatura, concentración de enzimas y pH. Primero, aplicamos un Diseño de Factor Fraccionario (DFF) 2^{3-3} para seleccionar las variables más influyentes en el proceso con cada enzima a aplicar en el DRCC. Del DFF, seleccionamos la temperatura y la concentración de enzimas para Alcalase 2.4L® y Novo-Pro® D, la temperatura y el pH para Neutrase®. El grado máximo estimado de hidrólisis (GH_{max}) con Alcalase 2.4L® fue del 60,05 % en un proceso de 180 min a 39,03 °C y una concentración de enzima del 0,65 %. Neutrase® logró una GH_{max} del 56,96 % durante 120 min a 39,46 °C y un pH de 6,039, mientras que Novo-Pro® D tuvo una GH_{max} del 54,76 % durante 60 min a 47,95 °C y una

concentración de enzima del 0,866 %. Por lo tanto, las tres enzimas mostraron resultados prometedores para obtener HPP con alto contenido de GH a partir de recortes de filete de tilapia del Nilo.

Palabras clave: Hidrólisis enzimática; Optimización; Subproductos de pescado; Proteína; Proteasa.

1 Introdução

A crescente demanda mundial por proteína foi intensificada devido ao reconhecimento da importância deste componente na dieta para manutenção da saúde humana, principalmente para pessoas com problemas restritivos, atletas e idosos (Egerton, et al. 2017). De acordo com a FAO (2020), cerca de 12% de todo o pescado produzido no mundo, que corresponde a espécies de baixo valor comercial e coprodutos da indústria de processamento é subutilizado para fins não alimentares humanos, principalmente nas formas de farinha e óleo de peixe para alimentação animal. Neste cenário, o emprego de biotecnologias é cada vez mais explorado para otimizar a recuperação da proteína dos coprodutos de origem animal e incrementar seu valor de mercado (Mullen et al., 2017; Toldrá, Mora, & Reig, 2016).

A tilápia, *Oreochromis niloticus*, é uma das espécies mais produzidas em diversos países (FAO, 2020). Como o filé é o principal produto comercializado (Silva et al., 2016), elevadas quantidades de aparas do filé são geradas (Roslan et al. 2014b), sendo aproveitadas na fabricação de empanados, embutidos e outros produtos de menor valor. Por outro lado, devido ao potencial nutritivo e a necessidade de otimização do uso da matéria prima na indústria de processamento de pescado (Shen et al. 2012; Roslan et al. 2015), as aparas de filé de tilápia são uma excelente opção para a produção de hidrolisados proteicos de peixe (HPP).

Os HPPs obtidos por meio de hidrólise enzimática apresentam vantagens devido ao seu custo de fabricação relativamente baixo, elevado valor nutricional, propriedades funcionais adequadas à aplicação na indústria de alimentos, além de potencial para a obtenção de peptídeos com atividades biológicas específicas (Roslan et al. 2014b; Yarnpakdee et al. 2015; Amiza et al. 2017; Vaquéz et al. 2017).

A viabilidade técnica e econômica do emprego de enzimas reside nas condições amenas em que as reações ocorrem, minimização de produtos indesejáveis, qualidade e alto rendimento do produto final (Roslan et al. 2014b; Maluf et al, 2019). Essas vantagens decorrem da seletividade das enzimas aos substratos e da possibilidade de controle das condições do processo, como temperatura e pH, para obtenção de produtos com características e finalidades específicas (Amiza et al. 2012; Roslan et al. 2014b; Silva et al. 2014).

A hidrólise via enzimática é realizada por proteases que clivam ligações peptídicas, transformando cadeias proteicas de alto peso molecular em moléculas menores e aminoácidos livres, aumentando a reatividade e melhorando as propriedades funcionais das proteínas (Foh et al. 2010; Amiza et al. 2017; Nelson and Cox 2014). As enzimas proteolíticas mais comumente utilizadas em processos de hidrólise de proteínas de pescado são Alcalase®, papaína, pepsina, tripsina, quimiotripsina, pancreatina, Flavourzyme®, Pronase®, Neutrase®, Protamex®, bromelina, Protease N®, termolisina, e Validase® (Raghavan and Kristinsson 2008; Je et al. 2009; Foh et al. 2010; Hsu 2010; Ngo et al. 2010; Roslan et al. 2014a; Roslan et al. 2014b; Yarnpakdee et al. 2014; Roslan et al. 2015; Amiza et al. 2017).

Em geral, são empregadas na indústria, enzimas de alta relação atividade/custo (Maluf et al, 2019). Para hidrólise proteica, destacam-se as endopeptidases Alcalase 2.4L ® e a Neutrase ®, ambas desenvolvidas pela empresa Novozymes. A Alcalase 2.4L ®, originada do *Bacillus licheniformis*, atua sob condições moderadas de alcalinidade e temperatura e é capaz de proporcionar alto grau de hidrólise em um período relativamente curto (Adler-Nissen, 1986; Foh et al, 2010; Amiza et al. 2017; Egerton et al, 2017). Já a Neutrase ®, obtida do *B. amyloliquefaciens*, é empregada comercialmente para "melhorar" proteínas de origem animal e vegetal, e atua em pH neutro sob condições amenas de temperatura (Foh et al, 2010; Amiza et al. 2017; Egerton et al, 2017). Enquanto isso, a Novo Pro-D ® produzida por *B. licheniformis* geneticamente modificada também tem demonstrado potencial de aplicação (Maluf et al 2019; Lopes et al, 2020). Para que o processo de hidrólise enzimática ocorra de forma eficiente, visando a obtenção de um produto com características adequadas a uma dada aplicação, são primordiais a escolha da enzima adequada e o controle das condições processuais (Ishak and Sarbon, 2018). As variáveis mais importantes nas reações enzimáticas são a concentração e especificidade da enzima, a temperatura e o pH da reação e a natureza do substrato (Roslan et al. 2015;

Amiza et al. 2017). A eficiência do processo de hidrólise é mensurada pelo grau de hidrólise (GH), definido como a porcentagem de ligações peptídicas quebradas ao longo da reação (Adler-Nissen, 1979). Deste modo, o conhecimento do GH possibilita a elaboração de produtos com propriedades definidas e maior rendimento (Foh et al. 2010).

Produtos altamente específicos com GH máximo podem ser obtidos através da otimização das condições de hidrólise de proteínas (Ishak and Sarbon, 2018; Kristinsson and Rasco, 200). Para a indústria, isso significa a viabilização técnica e econômica do processo, com máximo aproveitamento do recurso disponível (Ishak and Sarbon, 2018). No meio científico, a técnica de delineamentos centrais compostos, seguidas de análises estatísticas de Superfície de Resposta, são as metodologias comumente empregadas para otimizar as condições de processos químicos (Amiza et al. 2012, Amiza et al. 2011).

Diante do exposto, avaliamos as condições de hidrólise enzimática de aparas de filé da tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, utilizando três diferentes enzimas: Alcalase®, Neutrase® e Novo-Pro D®. Especificamente, para cada enzima identificamos as condições que resultam em maiores clivagens de proteínas, otimizando assim os processos de obtenção dos hidrolisados proteicos de peixe (HPPs).

2 Metodologia

Matéria prima

A matéria prima utilizada foi as aparas do filé de tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus*, disponibilizadas por um frigorífico da região de Toledo – Paraná - Brasil.

Preparo da matéria prima

As aparas foram trituradas em moinho elétrico com peneira de 5 mm, porcionadas em peso de 2 kg e armazenadas sob congelamento à -18°C, até sua utilização na elaboração dos hidrolisados.

Teor de proteína da matéria prima

O teor de proteína total da matéria prima foi determinado pelo método Kjeldahl baseado no método AOAC 925.40 (AOAC 2000), usando um fator de conversão de nitrogênio de 6,25.

Enzimas

As enzimas utilizadas para a hidrólise da matéria prima foram disponibilizadas pela empresa Novozymes Latin America Ltda. A Alcalase 2.4L® é uma endoprotease do tipo serina-protease alcalina, produzida pela bactéria *Bacillus licheniformis*, com subtilisina Carlsberg como seu principal componente, possuindo atividade específica de 2.4 Unidades Anson (AU) por grama.

A Neutrase® é uma endoprotease bacteriana produzida pela cepa *Bacillus amyloliquefaciens*, sendo empregada comercialmente para melhorar proteínas de origem animal e vegetal. Por tratar-se de uma metaloprotease, requer íons de zinco para a sua atividade. Esta enzima hidrolisa aleatoriamente as ligações peptídicas internas.

A Novo-Pro D® é uma endoprotease alcalina produzida por *Bacillus licheniformis* geneticamente modificados. É aplicada principalmente na indústria de *pet food* no processamento de proteínas animais para melhoramento do sabor. A atividade específica declarada pelo fabricante é de 16 quilo unidades Novo Protease por grama (KNPU-S/g).

Produção do hidrolisado proteico de peixe (HPP)

Os HPP's foram preparados em reator experimental de vidro borossilicato, encamisado com banho termostático acoplado.

Para cada ensaio, preparou-se uma suspensão com 2 kg de matéria prima e 20% de água. O pH e a temperatura desta suspensão foram ajustados conforme a condição específica de cada ensaio. Para o ajuste do pH, foi empregada uma solução de carbonato de sódio anidro P.A. 10%. Em seguida, a enzima foi adicionada à suspensão sob agitação constante, conforme quantidade definida em cada experimento.

Inativação Enzimática

Ao final do processo de hidrólise, foi realizada a inativação da enzima em banho maria termostatizado à temperatura de 90°C por um período de tempo de 20 min. Posteriormente, resfriou-se a suspensão em banho de gelo, e o conteúdo hidrolisado foi armazenado sob refrigeração.

Proteína solúvel e grau de hidrólise

Para a determinação da proteína solúvel (PS) dos HPP's, inicialmente as amostras de cada hidrolisado foram centrifugadas a uma rotação de 2600 rpm por 20 min. Em

seguida, o sobrenadante foi coletado, diluído com ácido tricloroacético (TCA) 6,25% na proporção de 1:1, e deixadas em repouso por 30 min. Após a precipitação do material insolúvel com o TCA, as amostras foram filtradas em papel Whatman nº 40, para remoção das impurezas. O teor de proteína solúvel do filtrado foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951), em espectrofotômetro em comprimento de onda de 750 nm. O valor obtido foi expresso em miligramas de albumina. O grau de hidrólise (GH) foi estimado segundo o método descrito por Hoyle and Merritt (1994) e Liceaga-Gesualdo and Li-Chan (1999), o qual relaciona as proteínas solubilizadas em TCA presentes na amostra e as proteínas totais inicialmente existentes na matéria prima:

$$GH = (\text{PS em 6,25\% TCAPT}) \times 100 \quad (1)$$

onde GH é o grau de hidrólise, PS é a proteína solúvel do hidrolisado proteico (miligramas por grama), PT é a proteína total do substrato (miligramas por grama).

Otimização do processo de obtenção dos HPP's

Inicialmente foi aplicado um Planejamento Fatorial Fracionado PFF 2^{3-3} (3 pontos centrais, total de 11 ensaios) para a avaliação do efeito do pH, da temperatura em graus Celsius (T) e da concentração da enzima (E) como porcentagem em relação ao substrato sobre o grau de hidrólise (GH). O tempo de hidrólise foi fixado em 1 h. As faixas das condições de pH, T e E variaram de 7,5 a 9,5, 55 a 75°C e 0,05 a 0,25% para a hidrólise com a enzima Alcalase®, 6 a 8, 40 a 60°C e 0,1 a 0,5% para a Neutrase® e finalmente, de 7,5 a 9,5, 60 a 80°C e 0,5 a 2,5% para a Novo-Pro D®, de acordo com a ficha técnica das enzimas fornecidas pelo fabricante.

A partir das respostas obtidas no primeiro planejamento, um novo planejamento do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 (4 ensaios, 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios) foi aplicado para otimizar o processo de hidrólise das aparas de tilápia do Nilo. A influência das variáveis significativas foi avaliada pela resposta do GH.

De acordo com os resultados obtidos com o primeiro planejamento, as variáveis que influenciaram significativamente na hidrólise de aparas do filé de tilápia do Nilo com a Alcalase® foram T e E, com a Neutrase®, pH e T, e com a Novo Pro-D®, apenas T. No caso da Novo Pro-D®, a variável E foi avaliada no segundo planejamento, apesar de

não ter sido significativa no primeiro, devido a literaturas consultadas (Fountoulakis & Lahm, 1998; Dey & Dora, 2011; He et al, 2013). A Tabela 2 apresenta os níveis reais e codificados das variáveis estudadas no DCCR 2² para hidrólise de aparas do filé de tilápia-do-Nilo hidrolisado com Alcalase®, Neutrase® e Novo-Pro D®.

Tabela 2 - Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no DCCR 22 para hidrólise de aparas do filé de tilápia-do-Nilo com emprego das enzimas Alcalase®, Neutrase® e Novo-Pro D®: temperatura (T, °C), concentração enzimática (E, %) e pH.

Níveis codificados	Alcalase®		Neutrase®		Novo-Pro D®	
	T (x1)*	E (x2)*	T (x1)	pH (x2)	T (x1)	E (x2)
-1,41	29,9	0,1	27,5	5,2	35,9	0,2
-1	34,0	0,3	30,0	5,4	40,0	0,4
0	44,0	0,6	36,0	5,8	50,0	0,8
1	54,0	0,9	42,0	6,2	60,0	1,2
1,41	58,1	1,0	44,5	6,4	64,1	1,4

*x1 e x2 são os símbolos que representam as variáveis estudadas para cada enzima nas equações dos modelos de superfície de resposta aplicados.

Os ensaios com a Alcalase® e Novo-Pro D® foram realizados sob pH de 7,5, variando T e E. Já os ensaios com a Neutrase® foram com E fixa em 0,5%, variando a T e pH. A duração dos ensaios com Alcalase®, Neutrase® e Novo-Pro D® foi de 3, 2 e 1h, respectivamente.

Para um sistema de 2 fatores, a equação do modelo de superfície de resposta de segunda ordem é:

$$Y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+b_{12}x_1x_2+b_{11}x_1^2+b_{22}x_2^2 \quad (2)$$

onde Y é a resposta prevista, b₀ é o intercepto, b₁ e b₂ são os coeficientes lineares, b₁₂ é o coeficiente de interação e b₁₁ e b₂₂ são os coeficientes quadráticos.

Computacionalmente, o lado direito do modelo é representado por SO (x₁, x₂).

Os valores obtidos nos ensaios experimentais foram analisados no software R (R Core Team, 2019), com auxílio do pacote rsm (Lenth, 2009). Foram desenvolvidos gráficos de superfície de resposta e para demonstrar os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta avaliada.

3 Resultados e discussão

Teor de proteína da matéria prima

A proporção de proteína total nas aparas de filé da tilápia do Nilo foi de $16,53 \pm 0,32\%$. Essa quantidade de proteína foi ligeiramente inferior aos $18,65\%$ (Herath et al., 2016) e $19,95\%$ (Wu et al., 2017) observados em filés e músculos desta espécie, respectivamente. No entanto, essa pequena variação na composição química do pescado é natural, visto que ela pode variar com o tamanho, idade, estação sazonal e estado nutricional do peixe (Ogawa, 1999; Nollet and Toldrá, 2010). Além disso, as proporções de água, gordura e proteína variam ao longo do corpo do peixe e até mesmo entre as partes comestíveis (Nollet e Toldrá, 2010).

Tabela 3 - Grau de hidrólise (GH) do hidrolisado proteico de aparas de filé de tilápia do Nilo em testes de temperatura (T), concentração enzimática (E) e pH, utilizando as enzimas Alcalase®, Neutrase® e Novo-Pro D®.

Ensaio	Alcalase®			Neutrase®			Novo-Pro D®		
	T	E	GH	T	pH	GH	T	E	GH
1	34,0	0,3	43,18	30,0	5,4	33,04	40,0	0,4	46,95
2	54,0	0,3	50,72	42,0	5,4	40,87	60,0	0,4	49,85
3	34,0	0,9	52,17	30,0	6,2	37,53	40,0	1,2	50,14
4	54,0	0,9	40,58	42,0	6,2	46,29	60,0	1,2	46,95
5	29,9	0,6	57,09	27,5	5,8	32,84	35,9	0,8	52,75
6	58,1	0,6	45,50	44,5	5,8	42,46	64,1	0,8	49,27
7	44,0	0,1	36,81	36,0	5,2	34,58	50,0	0,2	46,08
8	44,0	1,0	53,59	36,0	6,4	43,56	50,0	1,4	50,14
9	44,0	0,6	58,55	36,0	5,8	45,01	50,0	0,8	54,49
10	44,0	0,6	57,97	36,0	5,8	44,63	50,0	0,8	54,20
11	44,0	0,6	60,58	36,0	5,8	44,78	50,0	0,8	55,36

Otimização do processo de obtenção dos HPP's

Os graus de hidrólises (GH) nos hidrolisados proteicos de aparas de filé de tilápias (HPP) variaram entre 36,81 e 60,58% para Alcalase®; 32,84 e 46,29% para Neutrase® e 46,08 e 55,36% para Novo-Pro D® (Tabela 2).

Na Tabela 4, os pontos estacionários são para temperatura (T, °C), concentração de enzima (E, %) e pH. GHmax é o grau máximo de hidrólise estimado em pontos

estacionários. Como esperado, os graus de hidrólises nos HPP, obtidos com os empregos de Alcalase®, Neutrase® e Novo-Pro D®, apresentaram relações de segunda ordem significativas ($p < 0.05$) com as variáveis utilizadas no DCCR 2², com valores de R² superiores a 85%, e portanto, adequados para explicar a variabilidade dos dados (Joglekar and May, 1987). Todos os métodos empregados apresentaram valores máximos estimados acima de 50% de grau de hidrólise (GH_{max}). No entanto, a enzima Alcalase® foi mais eficiente na clivagem de proteína de aparas do filé de tilápia do Nilo, seguida pela enzima Neutrase® e Novo Pro-D® (Tabela 3). Também foram observadas superioridades da Alcalase® em relação à Neutrase® para a hidrólise de músculo de *Oreochromis niloticus* (Foh et al., 2010) e de *C. niveatus* (Shen et al., 2012). Entretanto, Egerton et al. (2018), avaliando o emprego de diferentes enzimas na hidrólise de *M. poutassou*, constatou que a Alcalase® proporcionou menor GH em relação à Neutrase®, possivelmente devido condições de pH, temperatura, concentração enzimática e tipo de substrato, distintas das que foram exploradas na presente pesquisa.

Tabela 4 - Estatísticas do modelo de superfície de resposta de segunda ordem (SO(x1, x2)) aplicado para otimização do grau de hidrólise em hidrolisado protéico de peixe (HPP) utilizando as enzimas Alcalase®, Neutrase® e Novo Pro-D®.

Método	F _(5, 5)	p	R ²	Pontos estacionários	GH _{max}
Alcalase®	8.890	0.0158	0.8989	(T=39.93; E=0.677)	60.05
Neutrase®	88.00	<0.0001	0.9888	(T=39.46; pH=6.039)	56.96
Novo Pro-D®	8.343	0.0181	0.8930	(T=47.95, E=0.866)	54.76

A temperatura afeta a velocidade de reação durante a clivagem da proteína, a energia de ativação da reação catalítica e a estabilidade térmica da enzima e do substrato (Shen et al., 2012). Segundo Shen et al. (2012), o GH aumenta com a temperatura até atingir um valor ótimo, acima do qual o GH começa a diminuir. Isto ocorre porque temperaturas mais elevadas interrompem a força que mantém a forma da molécula da enzima, que é gradualmente desnaturada, enquanto em temperaturas relativamente baixas, a taxa de reação enzimática é desacelerada, a energia cinética das moléculas diminui e as colisões entre elas são menos frequentes. Desta forma, o ótimo de temperatura para a atividade enzimática resulta da aceleração da reação e do aumento da desnaturação devido a elevação da temperatura (Whitaker 1994; Nelson and Cox 2014).

Já a concentração da enzima pode afetar de diferentes formas a eficiência da reação enzimática com o substrato. Em termos gerais, a velocidade da reação enzimática

aumenta com o incremento da concentração da enzima. Entretanto, na medida em que as reações ocorrem começa ocorrer inibição da atividade enzimática devido a formação de compostos que competem por ligações em sítios ativos ou sítios alostéricos da enzima e do substrato (Nelson and Cox, 2014). Além desta competição, ocorre a redução de substrato devido às sucessivas clivagens, o que aumenta a probabilidade de uma molécula inibidora se ligar à enzima (Nelson and Cox, 2014).

Além da temperatura e da concentração da enzima, a atividade enzimática sofre a influência do pH. De acordo com Shen et al. (2012), condições elevadas ou reduzidas de pH causam diminuição na atividade da enzima, uma vez que o sítio ativo fica progressivamente distorcido, influenciando negativamente a função enzimática. Segundo Whitaker (1994), o pH age sobre o sítio ativo das enzimas, devido a interações hidrofóbicas e hidrofílicas, podendo reduzir a atividade da enzima de forma reversível ou até mesmo desnaturá-la.

Assim, as relações polinomiais obtidas nos modelos de superfície de resposta indicam que os ensaios experimentais foram realizados adequadamente, permitindo identificar as condições ótimas com máximo GH para produção de HPP em relação aos fatores avaliados (Figura 2).

O GH máximo estimado com o emprego da Alcalase[®], 60,05% para temperatura de 39,93°C e concentração de enzima de 0,677%, em 180 min de processo, foi relativamente superior à valores já reportados com o uso desta mesma protease. Também em processo de otimização de temperatura, concentração de enzima e pH, em hidrolisados gerados com músculo de tilápia-do-Nilo foi obtido 25,16% de GH (Roslan et al., 2014a), 20,42% de GH a partir de coprodutos da tilápia (Roslan et al., 2015), 20,20% de GH a partir de coprodutos da tilápia (Roslan et al., 2014b), 25% de GH a partir de músculo de tilápia (Foh et al., 2010) e 34,73% de GH a partir de vísceras e carcaças de tilápia (Silva et al., 2014). Nossos resultados também foram superiores ao emprego da Alcalase[®] para hidrólise em outras espécies, como para o *M. poutassou* inteiro, que obteve 18% de GH (Egerton et al. 2018) e vísceras de atum *K. Pelamis*, com GH de 35% (Klomklao and Benjakul, 2016). Diante disto, constata-se que a hidrólise enzimática é fortemente afetada por diferentes condições operacionais do processo.

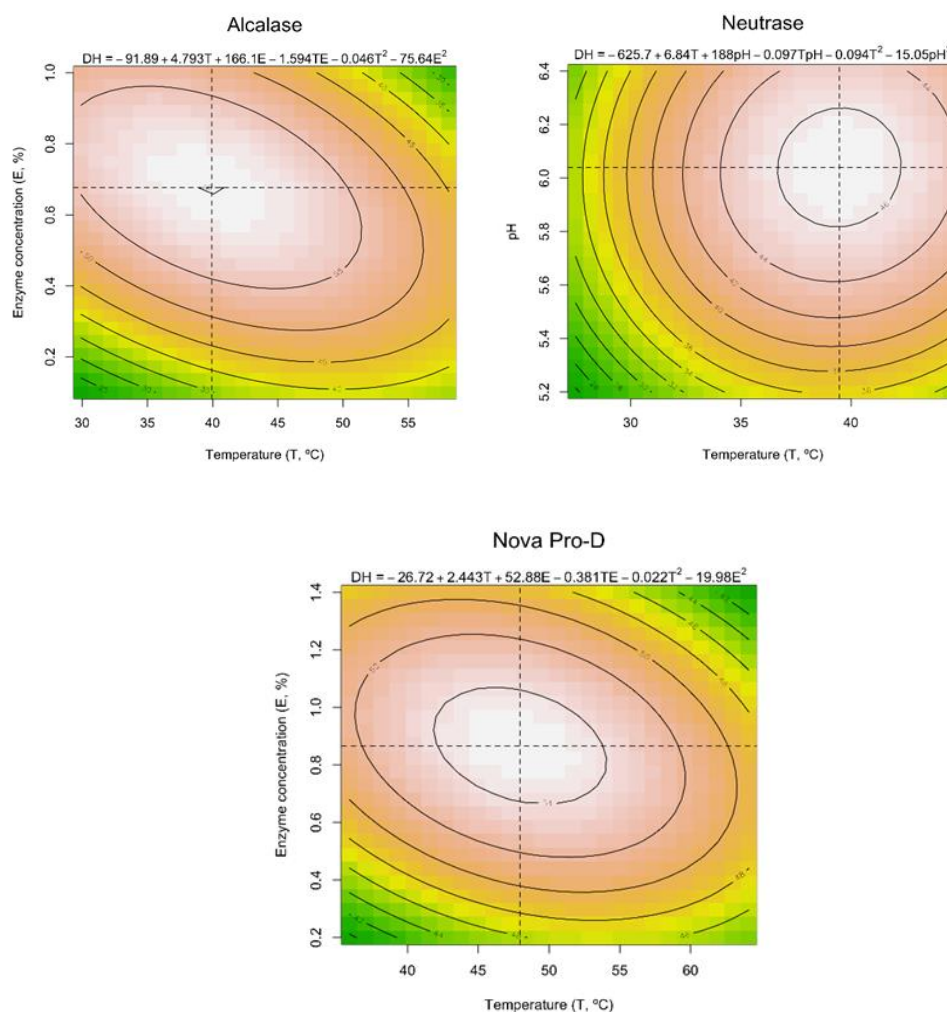


Figura 2- Superfície de resposta gerado para o GH do HPP obtido utilizando Alcalase® (a), Neutrase® (b) e Novo-Pro D® (c). As linhas tracejadas indicam pontos estacionários.

Apesar da superioridade do GH alcançado com a Alcalase® em relação às outras proteases, Shen et al. (2012) ressaltam a possibilidade de formação de produtos não atrativos. Isto ocorre porque com altos GH, ocorrem maiores formações de fenilalanina, peptídeos curtos e aminoácidos com grupos hidrofóbicos, que são os responsáveis por sabor amargo no produto, e nos quais estão os sítios ativos que geralmente a Alcalase® se liga.

Ainda, Shen et al. (2012) avaliaram a aplicação, dentre outras enzimas, da Alcalase® e Neutrase® para a hidrólise de músculo de *C. niveatus*, obtendo GHs de hidrólise de 17,03 e 15,04%. Apesar da Neutrase® ter apresentado resultado inferior em termos de GH em relação à Alcalase®, os autores enfatizaram que em termos de sabor do produto final, a Neutrase® mostrou-se superior, devido à formação de alanina, ácido

aspártico e ácido glutâmico, responsáveis pelos sabores umami e doce. Portanto, a escolha de uma enzima ou outra deve, além do GH, levar em consideração o objetivo de aplicação do produto final.

Em relação a Neutrase[®], as condições do processo de hidrólise de aparas do filé de tilápia-do-Nilo foram otimizadas em temperatura de 39,46°C e pH de 6,039, resultando num GH máximo estimado em 56,96%, em 120 min de processo. Este máximo atingido é mais que o dobro relatado por Egerton et al. (2018) com o emprego desta enzima para a hidrólise de *M. poutassou*. Em estudo realizado por Foh et al. (2010), a hidrólise de músculo de tilápia-do-Nilo com aplicação da Neutrase[®] proporcionou apenas 5% de GH em 120 min de processo. Estas discrepâncias entre os GH's reportados podem ser devido à temperatura e o pH acima dos ótimos determinados no presente estudo, afetando negativamente a eficiência da clivagem da proteína, mesmo sob maiores concentrações de enzimas.

A Novo-Pro D[®] apresentou GH_{max} estimado próximo ao da Neutrase[®], com 54,76% para temperatura de 47,95°C e concentração de enzima em 0,866%, em 60 min de processo. Existe pouca literatura científica sobre a enzima Novo-Pro D[®]. Sabe-se que se trata de uma endoprotease, e, portanto, age aleatoriamente sobre ligações peptídicas no interior da cadeia polipeptídica (Whitaker 1994). Além disso, possui atividade muito próxima, levemente inferior à atividade da enzima Alcalase[®], embora esta tenha velocidade de reação inicial inferior à da Novo-Pro D[®] (Kamnerdpetch et al. 2007). Tanto o Novo-Pro D[®] quanto a Alcalase[®] são classificados como serina-proteases. Entretanto, Novo-Pro D[®] possui uma divisão preferida nos aminoácidos contendo anéis aromáticos e enxofre, nomeadamente, histidina, fenilalanina, triptofano e tirosina, enquanto a Alcalase[®] tem um amplo padrão, com clivagem preferencial nos aminoácidos aromáticos (Tavano 2013; Warglay and Karboune, 2016).

Dentre as enzimas avaliadas para a obtenção dos HPP's das aparas de filés de tilápia, a Novo-Pro D[®] foi a que apresentou maior velocidade de reação, sendo o mesmo constatado por Kamnerdpetch et al. (2007). Nas condições ótimas de processo com a enzima, o GH predito é de 54,76% em 60 min de hidrólise. Ao comparar os resultados da Alcalase[®] com os da Novo-Pro D[®], nota-se que o processo é mais lento na primeira, ao passo que a segunda exige temperatura superior. Os dois fatores são limitantes na viabilidade de um processo para obtenção de HPP's em escala industrial e ambos devem ser levados em consideração na escolha da enzima a ser empregada na produção.

Ressaltamos que, para reafirmar os resultados previstos nas condições otimizadas, novos ensaios experimentais foram realizados (dados não mostrados), os quais corroboram as respostas previstas para o processo sob condições ótimas. Isso indica que a estratégia adotada para otimizar as condições de hidrólise enzimática e obter o maior GH empregada neste estudo foi bem-sucedida.

4 Conclusão

As três enzimas avaliadas apresentaram resultados promissores, com GHs acima de 50%, para a obtenção de HPP's a partir de aparas do filé de tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus*:

- O processo de hidrólise com Alcalase[®] foi otimizado a 39,93°C e 0,677% de concentração de enzima, gerando 60,05% de grau de hidrólise em 180 min, sob pH de 7.5;

- O processo de hidrólise com Neutrase[®] foi otimizado a 39,46°C e pH 6,039, gerando 56,96% de grau de hidrólise em 120 min, sob concentração de enzima de 0.5%;

- O processo de hidrólise com Novo-Pro D[®] foi otimizado a 47,95°C e 0,866% de concentração de enzima, gerando 54,76% de grau de hidrólise em 60 min, sob pH de 7.5.

Estudos relativos à caracterização nutricional, funcional e composição química devem ser realizados para conhecer a potencialidade de aplicação de cada um dos HPP's desenvolvidos sob o processo otimizado.

5 Referências

Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256–1262. doi: <https://doi-org.ez109.periodicos.capes.gov.br/10.1021/jf60226a042>.

Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymatic hydrolysis of food proteins*. (1st. ed.). Elsevier Science Publishing Co.

Amiza, M. A., Liyana, H. A. & Zaliha, H. (2017). Optimization of enzymatic protein hydrolysis conditions to obtain maximum angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity from Angel Wing Clam (*Pholas orientalis*) meat. *Madridge Journal of Food Technology*, 2(1), 65-73. doi: 10.18689/mjft-1000110

Amiza M. A. & Masitah M. (2012). Optimization of enzymatic hydrolysis of blood cockle (*Anadara granosa*) using Alcalase. *Borneo Science*, 31, 1-8.

Amiza, M. A., Nurul Ashikin, S. & Faazaz, A. L. (2011). Optimization of Enzymatic Protein Hydrolysis from Silver Catfish (*Pangasius* sp.) Frame. *International Food Research Journal*, 18(2), 775-781.

AOAC (2016). *Official Methods of Analysis*. (20 ed.). Rockville: AOAC Internacional.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2019). *Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal* (2nd ed.). Brasília: MAPA.

Dey, S. S. & Dora, K. C. (2011). Optimization of the production of shrimp waste protein hydrolysate using microbial proteases adopting response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 51(1), 16-24. doi: 10.1007/s13197-011-0455-4

Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C. & Ross, R. P. (2018). Characterization of protein hydrolysates from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) and their application in beverage fortification. *Food Chemistry*, 245, 698–706. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.10.107

Foh, M. B. K., Qixing, J., Amadou, I. & Xia, W. S. (2010). Influence of ultrafiltration on antioxidant activity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(5), 227-235.

Fountoulakis, M. & Lahm, H. (1998). Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*, 826, 109-134. doi: 10.1016/S0021-9673(98)00721-3

FAO (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA)*. Rome: FAO.

Giannetto, A., Esposito, E., Lanza, M., Oliva, S., Riolo, K., Di Pietro, S., ... & Macrì, F. (2020). Protein hydrolysates from anchovy (*Engraulis encrasicolus*) waste: In vitro and in vivo biological activities. *Marine drugs*, 18(2), 86. doi: <https://doi.org/10.3390/md18020086>

He, S., Franco, C. & Zhang, W. (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *International Food Research Journal*, 50 (1), 289–297.

Herath, S. S., Haga, Y. & Satoh, S. (2016). Effects of long-term feeding of corn co-product-based diets on growth, fillet color, and fatty acid and amino acid composition of Nilo tilapia, (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 464, 205-212. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.06.032

Hoyle, N. & Merrit, J. H. (1994). Quality of fish protein hydrolysate from herring. *Journal of Food Science*, 1, 4769-4774.

Hsu, K. (2010). Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chemistry*, 122, 42-48. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.013>

Ishak, N. & Sarbon, N. (2018). A Review of Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides Deriving from Wastes Generated by Fish Processing. *Food Bioprocess Technology*, 11, 2-16. doi: <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1940-1>

Jafarpour, A., Gregersen, S., Marciel Gomes, R., Marcatili, P., Hegelund Olsen, T., Jacobsen, C., ... & Sørensen, A. D. M. (2020). Biofunctionality of enzymatically derived peptides from codfish (*gadus morhua*) frame: Bulk in vitro properties, quantitative proteomics, and bioinformatic prediction. *Marine drugs*, 18(12), 599. doi: <https://10.3390/md18120599>

Joglekar, M. & May, T. (1987). Product excellence through design of experiments. *Cereal Food World*, 32, 857-868.

Kamnerdpetch, C., Weiss, M., Kasper, C. & Scheper, T. (2007). An improvement of potato pulp protein hydrolyzation process by the combination of protease enzyme systems. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 508-514. doi: <https://10.1016/j.enzmictec.2006.05.006>

Klomklao, S. & Benjakul, S. (2016). Utilization of tuna processing byproducts: protein hydrolysate from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) viscera, *Journal of Food Processing and Preservation*, 41, e12970. doi: <https://doi.org/10.1111/jfpp.12970>

Kristinsson, H. G. & Rasco, B. A. (2010). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43-81. doi: <https://doi.org/10.1080/10408690091189266>

Lenth, R. V. (2009). Response-Surface Methods in R, Using RSM. *Journal of Statistical Software*, 32(7), 1–17. doi: <https://10.18637/jss.v032.i07>

Liceaga-Gesualdo, A. M. & Li-Chan, E. C. Y. (1999). Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 64, 1000-1004. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb12268.x>

Lopes, A. L., Novelli, P. K., Fernandez-Lafuente, R., Tardioli, P. W. & Giordano, R. L. C. (2020). Glyoxyl-Activated Agarose as Support for Covalently Link Novo-Pro D: Biocatalysts Performance in the Hydrolysis of Casein. *Catalysts*, 10, 466. doi: <https://doi.org/10.3390/catal10050466>

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, 265-275.

Maluf, J. U., Fiorese, M. L., Maestre, K. L., Passos, F. R., Finkler, J. K., Fleck, J. F. & Borba, C. E. (2019). Optimization of the porcine liver enzymatic hydrolysis conditions. *Journal of Food Process Engineering*, 2020, e13370. doi: <https://doi.org/10.1111/jfpe.13370>

Messina, C. M., Manuguerra, S., Arena, R., Renda, G., Ficano, G., Randazzo, M., ... & Santulli, A. (2021). In Vitro Bioactivity of Astaxanthin and Peptides from Hydrolysates of Shrimp (*Parapenaeus longirostris*) By-Products: From the Extraction Process to Biological Effect Evaluation, as Pilot Actions for the Strategy “From Waste to Profit”. *Marine Drugs*, 19(4), 216. doi: <https://doi.org/10.3390/md19040216>

Mullen, A. M., Alvarez, C., Zeugolis, D. I., Neill, E. O. & Drummond, L. (2017). Alternative uses for co-products: Harnessing the potential of valuable compounds from meat processing chains. *Meat Science*, 132, 90-98. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.243>

Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2014). *Princípios de bioquímica de Lehninger* (6 ed.). Porto Alegre: Artmed.

Ngo, D., Qian, Z., Ryu, B., Park, J. W. & Kim, S. (2010). In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Functional Foods*, 2, 107-117. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.02.001>

Nollet, L. M. L & Toldra, F. (2011). *Handbook of Analysis of Edible Animal By-Products*. New York: CRC Press.

Ogawa, M. (1999). *Alterações da carne de pescado por processamento e estocagem*. In: Ogawa, M. & Maia, E. L. Manual de pesca – ciência e tecnologia do pescado (221-249). São Paulo: Varela.

Shen, Q., Guo, R., Dai, Z. & Zhang, Y. (2012). Investigation of Enzymatic Hydrolysis Conditions on the Properties of Protein Hydrolysate from Fish Muscle (*Collichthys niveatus*) and Evaluation of Its Functional Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5192-5198. doi: 10.1021 / jf205258f

R Core Team (2019). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Recovered of <https://www.R-project.org/>

Raghavan, S. & Kristinsson, H. G. (2008). Antioxidative efficacy of alkali-treated Tilapia protein hydrolysates: A comparative study of five enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1434-1441. doi: 10.1021/jf0733160.

Roslan, J., Mustapa Kamal, S. M., Md. Yunus, K. F. & Abdullah, N. (2015). Optimization of enzymatic hydrolysis of tilapia (*Oreochromis niloticus*) byproduct using response surface methodology, *International Food Research Journal*, 22, 1117-1123.

Roslan, J., Kamal, S. M. M, Md. Yunus, K. F. & Abdullah, N. (2014a). Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Tilapia Muscle (*Oreochromis niloticus*) using Response Surface Methodology (RSM). *Sains Malaysia*, 43, 1715-1723.

Roslan, J., Md. Yunus, K. F., Abdullah, N. & Kamal, S. M. M. (2014b). Characterization of Fish Protein Hydrolysate from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-Product. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 312-319. doi: 10.1016/j.aaspro.2014.11.044

Silva, J. F. X., Ribeiro, J. F., Silva, J. S., Cahú, T. B. & Bezerra, R. S. (2014). Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. *Animal Feed*

Science and Technology, 196, 96-106. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.06.010>

Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90,1-11. doi:10.1016/j.molcatb.2013.01.011

Toldrá, F., Mora, L. & Reig, M. (2016). New insights into meat by-product utilization. *Meat Science*, 120, 54-59. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.021>

Tkaczewska, J., Borawska-Dziadkiewicz, J., Kulawik, P., Duda, I., Morawska, M., & Mickowska, B. (2020). The effects of hydrolysis condition on the antioxidant activity of protein hydrolysate from *Cyprinus carpio* skin gelatin. *Lwt*, 117, 108616. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108616>

Ucak, I., Afreen, M., Montesano, D., Carrillo, C., Tomasevic, I., Simal-Gandara, J., & Barba, F. J. (2021). Functional and bioactive properties of peptides derived from marine side streams. *Marine Drugs*, 19(2), 71. doi: <https://doi.org/10.3390/md19020071>

Vázquez, J. A., Blanco, M., Massa, A. E., Amado, I. R. & Pérez-Martín, R. I. (2017). Production of Fish Protein Hydrolysates from *Scyliorhinus canicula* Discards with Antihypertensive and Antioxidant Activities by Enzymatic Hydrolysis and Mathematical Optimization Using Response Surface Methodology. *Marine Drugs*, 15, 306. doi: <https://doi.org/10.3390/md15100306>

Waglay, A. & Karboune, S. (2016). Enzymatic Generation of Peptides from Potato Proteins by Selected Proteases and Characterization of Their Structural Properties, *Biotechnology Progress*, (32)2, 420-9. doi: 10.1002/btpr.2245

Whitaker, J. R. & Dekker, M., (1994). *Principles of Enzymology for the Food Sciences* (2th ed.), New York: Marcel Dekker.

Wu, F., Jiang, M., Wen, H., Liu, W., Tian, J., Yang, C. & Huang, F. (2017). Dietary vitamin E effects on growth, fillet textural parameters, and antioxidant capacity of genetically improved farmed tilapia (GIFT), *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture International*, 25, 991-1003. doi: 10.1007 / s10499-016-0089-7

Yarnpakdee S., Benjakul S., Kristinsson H. G. & Kishimura H. (2015). Antioxidant and sensory properties of protein hydrolysate derived from Nile tilapia (*Oreochromis*

niloticus) by one-and two-step hydrolysis. Journal of Food Science and Technology, 6, 3336-3349. doi: 10.1007 / s13197-014-1394-7

CAPÍTULO 3 – ARTIGO 2

Este artigo foi preparado para ser publicado na revista Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, ISSN:1644-0730, e-ISSN:1898-9594, classificada como B1 pela Capes.

Valorização de coprodutos de *Oreochromis niloticus* por hidrólise enzimática para obtenção de ingrediente de alto valor agregado para a indústria de alimentos

Resumo

Contexto: A produção de hidrolisados proteicos de peixe (HPPs) obtidos por meio de hidrólise enzimática destaca-se como tecnologia para agregar valor aos coprodutos do processamento de peixes resultando em produtos de alto valor biológico. O objetivo do presente experimento foi caracterizar os hidrolisados proteicos de peixe elaborados a partir de hidrólise enzimática de aparas de filé de *Oreochromis niloticus*, utilizando três diferentes enzimas: Alcalase[®], Neutrase[®] e Novo-Pro D[®].

Materiais e Métodos: Foram analisados a cinética do processo de hidrólise nos tempos 10, 20 30, 60, 120 e 180 min, as propriedades funcionais, solubilidade, capacidade de absorção de água e de óleo, higroscopicidade, atividade de água e cor, o conteúdo de minerais, por meio de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF), a composição química, através da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), a estabilidade térmica, por meio da calorimetria diferencial de varredura e a distribuição do peso molecular, através da cromatografia de camada delgada (CCD) e eletroforese.

Resultados: O HPP elaborado com a enzima Alcalase 2.4 L[®] se destacou dos demais quanto à solubilidade e teor de minerais superiores. Os HPPs elaborados com Alcalase 2.4 L[®] e Novo-Pro D[®] demonstraram melhores resultados na cinética do processo de hidrólise, com a última se destacando em relação à velocidade inicial da reação. Os melhores resultados de luminosidade e de capacidade de absorção de óleo foram apresentados pelos HPPs elaborados com Alcalase 2.4 L[®] e Neutrase D[®], com valores de L* de 90,76 e 90,31 e de absorção de óleo de 59,3 e 56,4%, respectivamente. A higroscopicidade foi menor para os HPPs elaborados com Neutrase D[®] e Novo-Pro D[®], com valores de 22,04 e 22,46%, respectivamente. O HPP elaborado com a enzima

Neutrase[®] se destacou dos demais quanto à capacidade de absorção de água, com valor de 132,9%. O conteúdo de P, Mg, Fe, Cu, Zn e Se foram superiores para o HPP com a Alcalase 2.4 L[®]. A análise de composição química revela a presença de grupos amina I, II e III, comprovando degradação da proteína em fragmentos menores e aminoácidos livres. A distribuição do peso molecular dos compostos revela o alto conteúdo de aminoácidos livres e proteínas de baixo peso molecular em todos os HPPs.

Conclusão: Os HPPs elaborados a partir de aparas do filé de *Oreochromis niloticus* com as enzimas Alcalase 2.4 L[®], Neutrase[®] e Novo-Pro D[®] apresentaram características satisfatórias em relação à cinética da reação enzimática, propriedades funcionais, conteúdo de minerais, estabilidade térmica e distribuição do peso molecular. Todos os HPPs demonstraram potencial para a utilização na indústria de alimentos, seja como alimento funcional ou como ingrediente de alto valor biológico para formulações especiais.

Palavras-chave: enzima, protease, aminoácido, peptídeo, proteína, propriedades funcionais

Introdução

As recentes mudanças no estilo de vida das pessoas em escala global trouxeram consigo novas demandas que precisam ser atendidas no âmbito socioeconômico e tecnológico (FAO, 2022). Esse é o caso da alimentação, cujo principal objetivo deixou de ser apenas o fornecimento de nutrientes essenciais para a manutenção da vida e passou a concentrar-se na busca por maiores benefícios à saúde (Tadesse et al., 2023).

É nesse contexto que o desenvolvimento e produção de alimentos funcionais ganha força. Destacam-se neste cenário alimentos ricos em aminoácidos essenciais e peptídeos de cadeia curta, que podem estar naturalmente presentes na matéria prima, formados durante o processamento, ou adicionados ao produto final (Tadesse et al., 2023).

Desta forma, a aquicultura destaca-se como fonte de coprodutos de elevado valor biológico a ser explorada, principalmente por ser abundante em proteínas e conter todos os aminoácidos essenciais (Yathisha et al., 2022). Além disso, apresenta elevado volume de geração de coprodutos, que pode chegar a 70% do peso vivo do animal (FAO, 2022).

Dentre esses coprodutos encontram-se carcaças, cabeças, peles, escamas, aparas de filé, entre outros. A possibilidade de agregação de valor a esses coprodutos vem despertando o interesse da indústria devido ao conteúdo biológico dessas matérias-primas (FAO, 2022). O emprego de biotecnologias, em especial a hidrólise enzimática, vem sendo difundido a fim de recuperar a proteína de coprodutos de origem animal (Gao et al., 2021; Maluf et al., 2020; Zhang et al., 2023)

A produção de hidrolisados proteicos de peixe (HPPs) obtidos por meio de hidrólise enzimática vindo sendo objeto de estudos recentes, devido ao seu custo de fabricação relativamente baixo, elevado valor nutricional, propriedades funcionais adequadas à aplicação na indústria de alimentos, além de potencial para a obtenção de peptídeos com atividades biológicas específicas (Hamed et al., 2022; Hassan et al., 2019; Tadesse et al., 2023; Taktak et al., 2021; Yathisha et al., 2022; Zhang et al., 2023).

A hidrólise via proteases cliva ligações peptídicas, transformando cadeias proteicas de alto peso molecular em moléculas menores e aminoácidos livres aumentando a reatividade e melhorando as propriedades funcionais das proteínas, (Tadesse et al., 2023; Zhang et al., 2023; Maluf et al., 2020;).

O emprego de enzimas no processo de obtenção de hidrolisados proteicos torna-se atrativo devido às condições amenas em que as reações ocorrem, minimização de produtos indesejáveis, qualidade e alto rendimento do produto final, além da possibilidade de controle das condições do processo para obtenção de produtos alimentícios com características e finalidades específicas (Maluf et al., 2020)

A formulação de um produto alimentício funcional depende não apenas da qualidade nutricional de seus ingredientes, mas também das propriedades estruturais, funcionais e bioativas dos mesmos. A maioria das proteínas íntegras não exibe funcionalidades desejáveis e bioatividades necessárias para desenvolver produtos alimentares funcionais, portanto, sua modificação para melhorar essas propriedades precisa ser abordada (Yathisha et al., 2022).

O grau de hidrólise (GH) influencia diretamente o peso molecular, propriedades funcionais, tipo e teor de peptídeos bioativos dos HPPs, bem como seu valor nutricional. Estudos relatam que quanto maior o GH, maior é o valor nutricional do produto e a presença de peptídeos com atividade antioxidante (Yathisha et al., 2022).

Diante do exposto, o objetivo do presente experimento foi caracterizar os hidrolisados proteicos de peixe elaborados a partir de hidrólise enzimática de aparas de filé da tilápia, *Oreochromis niloticus*, utilizando três diferentes enzimas: Alcalase[®], Neutrase[®] e Novo-Pro D[®].

Materiais e Métodos

Matéria-prima

Os Hidrolisados Proteicos de Peixe (HPPs) foram elaborados a partir de aparas de filé de *O. niloticus* fornecidas por um frigorífico de Toledo – Paraná - Brasil. Os animais abatidos foram obtidos de lotes de machos criados em tanques escavados em sistema de confinamento semi-intensivo. O ciclo de criação foi de abril a novembro, com temperatura média da água de 24 °C. A ração fornecida continha 32% de proteína bruta e o peso médio de abate foi de 700 g. As aparas foram moídas em moinho elétrico com peneira de 5 mm, separadas em pacotes de 2 kg e armazenadas por congelamento a -18°C até utilização na preparação de hidrolisados.

Enzimas

Todas as enzimas empregadas na elaboração dos HPPs são endoproteases e foram disponibilizadas pela Novozymes Latin America Ltda. A Alcalase 2.4L[®] é uma serina-protease obtida do *B. licheniformis*, tendo como principal componente a subtilisina Carlsberg. Sua atividade específica é de 2,4 Unidades Anson/g.

A Neutrase[®] é produzida por *B. amyloliquefaciens*. É uma metaloprotease e requer íons zinco para atividade. Esta enzima hidrolisa aleatoriamente ligações peptídicas. É empregada no aprimoramento do sabor de proteínas animais e vegetais.

A Novo-Pro[®] D[®] é obtida a partir do *B. licheniformis* geneticamente modificado. É usado principalmente no processamento de proteínas animais para a indústria *pet*. A atividade específica declarada pelo fabricante é de 16 quilos de novas unidades de protease (KNPU-S)/g.

Conteúdo proteico da matéria-prima

A matéria-prima foi caracterizada quanto ao teor de proteína total (928,08) (AOAC, 2016; Brasil, 2019). O as análises foram realizadas em triplicata.

Elaboração dos Hidrolisados Proteicos de Peixe (HPPs)

Os Hidrolisados Proteicos de Peixe (HPPs) foram preparados em um reator experimental revestido com banho termostático (Figura 3). Foram utilizados 2 kg de matéria-prima e 20% de água para o preparo de cada substrato. O pH, a temperatura, a concentração da enzima e o tempo de hidrólise foram ajustados de acordo com as condições específicas pré-determinadas em experimento anterior para cada enzima. O pH foi ajustado utilizando solução anidra de carbonato de sódio a 10%. Então, a enzima foi adicionada à suspensão com agitação constante. Ao final do processo de hidrólise, a enzima foi inativada em banho-maria termostático a 90°C por 20 min. O produto foi então resfriado em banho de gelo e o conteúdo hidrolisado foi armazenado a -4°C.

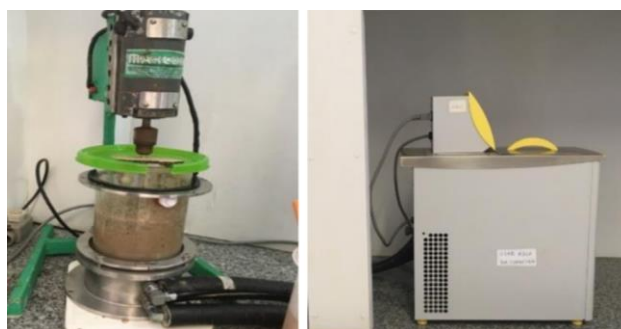


Figura 3 - Da esquerda para a direita, reator experimental e banho termostático e agitador mecânico.

Pré-ensaios

Para a elaboração dos HPPs avaliados no presente estudo foram realizados pré ensaios para a determinação dos parâmetros otimizados para cada enzima empregada na hidrólise de aparas de *Oreochromis niloticus* (Finkler et al., 2022). A hidrólise com Alcalase® foi otimizada a 39,93°C e 0,677% de concentração de enzima, gerando 60,05% de grau de hidrólise em 180 min, sob pH de 7,5. Já o processo com Novo-Pro D® foi otimizado a 47,95°C e 0,866% de concentração de enzima, gerando 54,76% de grau de hidrólise em 60 min, sob pH de 7.5. Enquanto isso, a hidrólise com Neutrase® foi otimizada a 39,46°C e pH 6,039, gerando 56,96% de grau de hidrólise em 120 min, sob concentração de enzima de 0,5%.

Ensaio

Novos ensaios foram conduzidos sob as condições de hidrólise enzimática previamente otimizadas. Os HPPs obtidos com o emprego das enzimas Alcalase[®], Neutrase[®] e Novo-Pro D[®] foram avaliados segundo a cinética da hidrólise, propriedades funcionais, e composição elementar, distribuição do peso molecular e estabilidade térmica.

Cinética da hidrólise enzimática

Para fins de comparação, a duração dos ensaios de hidrólise com o emprego de Alcalase[®], Neutrase[®] e Novo-Pro D[®] foi de 180 min, tempo máximo pré-determinado para alcançar o máximo grau de hidrólise (GH) do HPP elaborado com a enzima Alcalase[®]. Durante o processo, foram colhidas amostras dos HPPs antes da adição da enzima e nos tempos 10, 20, 30, 60, 120 e 180 min, para determinação do GH (Figura 4).

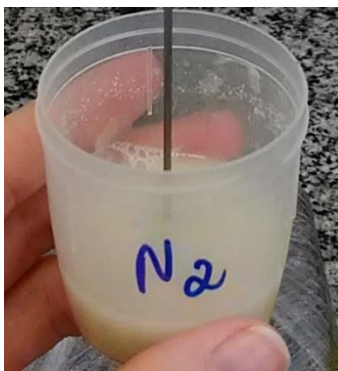


Figura 4 - Amostra colhida durante o ensaio de cinética da hidrólise enzimática.

Os valores obtidos para o GH em triplicatas foram avaliados com a análise de variância bifatorial para as fontes de variação Tempo e Enzima, ao nível de significância de 5%.

Proteína solúvel e Grau de Hidrólise (GH)

Para a determinação do teor de proteína solúvel, uma alíquota de 10 ml de cada amostra foi centrifugada (Excelsa Baby I Centrifugar) a 3023 g durante 20 min. O sobrenadante foi coletado, diluído com ácido tricloroacético (TCA) 6,25% na proporção de 1:1, e deixado em repouso por 30 min. Após a precipitação do material insolúvel em

TCA, as amostras foram filtradas através do filtro Whatman N°. 40 para remover impurezas. O teor de proteína solúvel foi determinado de acordo com Lowry et al. (1951) usando um espectrofotômetro em comprimento de onda de 750 nm. Os valores obtidos foram expressos em miligramas de albumina. O GH foi estimado conforme descrito por Hoyle e Merritt (1994) e Liceaga-Gesualdo e Li-Chan (1999), que relaciona as proteínas solubilizadas em TCA presentes na amostra e as proteínas totais inicialmente presentes na matéria-prima (equação 1).

Equação 1

$$GH (\%) = \frac{PS}{PT} \times 100$$

onde GH é o grau de hidrólise, PS é a proteína solúvel de HPP (mg/g) e PT é a proteína total do substrato (mg/g).

Secagem em spray dryer

A secagem dos HPPs foi realizada em *spray dryer* de escala laboratorial (MSDi 1.0, Labmaq do Brasil) (Figura 5), no Laboratório de Operações Unitárias e Fenômenos de Transporte da Universidade Tecnológica Federal do Paraná situado no campus Medianeira – PR. A operação de secagem foi conduzida sob condições constantes de pressão do compressor do ar de secagem (4 bar), vazão de ar comprimido de 45 L min⁻¹, temperatura do ar de 130°C, vazão de alimentação de 0,54 L h⁻¹ mantido por uma bomba peristáltica. A solução de alimentação foi mantida sob agitação em condições ambientes. O diâmetro de saída do ar no sistema foi de 0,2 mm em bico fluido e a temperatura de saída foi de 66°C. O produto seco foi recolhido no final do ciclone em recipientes de vidro hermeticamente fechados e armazenados a 4°C.



Figura 5 - *Spray Dryer* utilizado para realização da secagem dos HPPs.

Propriedades Funcionais

Solubilidade

A solubilidade foi determinada conforme Glória e Regitano-d'Arce (2000) e Morr et al. (1985), com modificações. Foram dispersos 0,2 g do HPP em 40 mL de água destilada (m/v) e agitados em agitador magnético (NOVA, Modelo NI 1101) por 10 min. Em seguida, o pH foi ajustado em 4, 6 e 8 adicionando-se HCl 2,0 mol L⁻¹ ou NaOH 2,0 mol L⁻¹. Posteriormente, a amostra foi transferida para tubos graduados tipo Falcon de 50 mL e centrifugada a 4097 g (25°C) por 15 min (Cientec, CT 5000-R, São Paulo, Brasil). Da mesma forma, foi elaborada uma amostra controle a qual não foi submetida ao ajuste de pH nem a centrifugação. Os conteúdos de proteínas dos sobrenadantes obtidos durante a centrifugação e da solução controle foram determinados de acordo com Lowry et al. (1951) utilizando como padrão solução de albumina 1,5 g L⁻¹ sendo que as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (PerkinElmer, UV-Vis Lambda XLS HP9 2FX,) a 730 nm. Os resultados foram expressos pelo percentual de solubilidade das amostras (equação 2).

Equação 2

$$S (\%) = \frac{PS_{sobrenadante}}{PS_{soluçãocontrole}} \times 100$$

onde S é a solubilidade e PS é a proteína solúvel em (mg/g).

Os valores obtidos para a solubilidade, em triplicatas, foram avaliados com a análise de variância bifatorial para as fontes de variação pH e Enzima, ao nível de significância de 5%.

Capacidade de Absorção de Água (CA_{água})

A Capacidade de Retenção de Água (CA_{água}) foi determinada de acordo com a metodologia de Köhn et al. (2015), com modificações. Os ensaios foram conduzidos em tubos graduados tipo Falcon de 15 mL com volume total de 5,0 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,01 mol L⁻¹ e 1 g de cada amostra. Em seguida, foi realizada a agitação das amostras em Vortex (Logen, LSM56-4, São Paulo, Brasil) seguido pelo repouso por 30 min e centrifugação a 1775 g (25°C) por 15 min (Cientec, CT 5000-R, São Paulo, Brasil). O sobrenadante obtido foi escorrido cuidadosamente sobre vidro relógio por 20 min. Por fim, pesou-se o tubo com o resíduo em balança analítica (Marte, AW220, São Paulo, Brasil). Os resultados foram determinados conforme a equação 3 e expressos em g de água absorvido por 100 g (%) de FPP.

Equação 3

$$CA_{\text{água}} (\%) = \frac{\text{Água absorvida}(g)}{\text{Peso inicial da amostra}(g)} \times 100$$

Os valores obtidos para a CA_{água} em triplicatas foram avaliados com a análise de variância unifatorial para a fonte de variação Enzima, ao nível de significância de 5%.

Capacidade de Absorção de Óleo (CA_{óleo})

Para a análise de Capacidade de Absorção de Óleo (CA_{óleo}) foi utilizada a metodologia de Lin, Humbert e Sosulski (1974), com algumas adaptações. Os ensaios foram conduzidos em tubos graduados tipo Falcon de 15 mL com volume total de 5,0 mL de óleo de soja e 1 g de amostra. Primeiramente, foi realizada a agitação da amostra em Vortex (Logen, LSM56-4, São Paulo, Brasil), seguido pelo repouso por 30 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 1775 g (25°C) por 15 min (Cientec, CT 5000-R, São Paulo, Brasil) e o sobrenadante foi escorrido cuidadosamente sobre vidro relógio por 20 min. Por fim, pesou-se o tubo com o resíduo em balança analítica (Marte, AW220, São Paulo, Brasil). Os resultados foram determinados conforme a equação 4 e expressos em g de óleo absorvido por 100 g de HPP (%).

Equação 4

$$CA_{\text{óleo}} (\%) = \frac{\text{Óleo absorvido}(g)}{\text{Peso inicial da amostra}(g)} \times 100$$

Os valores obtidos para a $CA_{\text{óleo}}$ em triplicatas foram avaliados com a análise de variância unifatorial para a fonte de variação Enzima, ao nível de significância de 5%.

Higroscopicidade

A higroscopicidade foi determinada conforme descrito por Silva et al. (2008) e Tonon et al. (2010) com modificações. Aproximadamente de 1 g de amostra foi pesada em células de vidro boro, previamente seco a $105 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ por 3 horas em estufa com circulação e renovação de ar forçada. Logo após, foram resfriados em dessecador com sílica gel até temperatura ambiente de $25 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. As células foram levadas para um dessecador contendo atmosfera com 75% de umidade relativa, mantida por uma solução de cloreto de sódio PA., 40%. As células permaneceram por 7 dias e a massa final foi pesada e a porcentagem de higroscopicidade determinada conforme equação 5. Os resultados foram expressos em $\text{g H}_2\text{O g}^{-1}$ da matéria seca.

Equação 5

$$\text{Higroscopicidade (\%)} = \frac{(f+H)}{(i-H)} \times 100$$

Onde f é a água adicionada; i é a massa inicial da amostra em (g); e H é a massa de água contida na amostra inicial em (g)

Os valores obtidos para a $CA_{\text{óleo}}$ em triplicatas foram avaliados com a análise de variância unifatorial para a fonte de variação Enzima, ao nível de significância de 5%.

Atividade de água (A_w)

Uma pequena quantidade de cada amostra foi colocada até cobrir o fundo de uma cápsula circular de polietileno. Em seguida, a cápsula foi inserida no equipamento Aqualab CX-2 T Braseq (Figura 6). A leitura foi feita automaticamente alguns minutos após o rastreamento de toda a amostra pelo equipamento.

Os valores obtidos para a atividade de água (A_w), em triplicatas, foram avaliados com a análise de variância unifatorial para a fonte de variação Enzima, ao nível de significância de 5%.



Figura 6 - Aqualab CX-2 T Braseq.

Cor

A cor foi avaliada utilizando colorímetro portátil Konica Minolta Sensing (Figura 7). Os resultados foram expressos em L^* , a^* , b^* , em que L^* (luminosidade ou brilho) variando de (0) preto ou (100) branco, croma a^* (-60) verde e (+60) vermelho e para croma b^* (-60) azul ao (+60) amarelo, conforme descrito por Dias e Leonel (2006). Os resultados obtidos, em triplicatas, foram avaliados com a análise de variância unifatorial para a fonte de variação Enzima, ao nível de significância de 5%.



Figura 7 - Colorímetro portátil Konica Minolta Sensing.

Composição elementar química

A concentração dos elementos químicos presentes nos HPPs foi determinada a partir da técnica analítica de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF), utilizando o equipamento Bruker, Modelo: S2 PICOFOX a partir de uma fonte de molibdênio incidindo raios X sobre a amostra com energia de 20 KV durante 1000 s, conforme Espinoza-Quiñones et al. (2015). As amostras dos HPPs após a secagem foram pesadas na quantidade de 30 mg e adicionadas ao tubo Falcon com capacidade de 4 a 5 mL com tampa de rosca externa, possuindo fundo cônico. Posteriormente adicionou-se 2,5 mL de triton 1% e 10 μL de gálio (1000 mg L^{-1}). Em seguida, a mistura foi disposta em um disco refletor de quartzo devidamente preparado. Para a fixação das amostras nos

discos de quartzo, foram pipetados 5 µL de solução de silicone em isopropanol no centro do disco e, em seguida, 5 µL da amostra, seguido de secagem a temperatura ambiente por 24 horas. Com posterior leitura no equipamento já descrito.

Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR).

Para as análises das amostras na região do infravermelho, foi realizada a varredura no intervalo comprimento de onda de 4000 a 650 cm⁻¹ utilizando o módulo de refletância total atenuada (ATR) em um equipamento FTIR Perkinelmer Frontier Spectrum 100 (PerkinElmer Frontier). Os dados obtidos foram analisados pelo software OriginPro 8.0.

Peso molecular

Para avaliação do peso molecular dos componentes das amostras, foram realizados ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e cromatografia de camada delgada (CCD).

Para os ensaios de SDS-PAGE, os ensaios foram realizados em condições desnaturantes como descrita por Laemmli (1970) usando gel na concentração de 12,5% de acrilamida. A coloração do gel foi realizada por Coomassie Brilliant Blue R-250 0,5% (p/v) em metanol:água:ácido acético (42:42:16 v/v/v). Os marcadores de massa molecular utilizados foram as proteínas: Fosforilase b (97 kDa), Albumina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa), Inibidor da tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

Os HPPs também foram analisados por Cromatografia de Camada Delgada comparativa de sílica eluída no sistema de solventes clorofórmio/metanol/água (5:4:1) e revelada com ninidrina para investigação de ácidos aminados. Foram aplicados 5 microlitros por amostra.

Calorimetria diferencial de varredura (DSC).

As análises de calorimetria diferencial de varredura dos HPPs foram feitas de acordo com a metodologia descrita por Fritzen-Freire et al. (2012), com modificações. Amostras de aproximadamente 2,00 mg foram acondicionadas em cadinhos de alumínio fechados. As amostras foram aquecidas de 30°C a 300°C com rampa de aquecimento de

10°C min⁻¹ e mantido sob fluxo constante de N₂ (20 mL min⁻¹). As análises de DSC foram realizadas em equipamento DSC 60 da marca SHIMADZU. Os dados obtidos foram analisados pelo software OriginPro 8.0.

Resultados e Discussão

Cinética da hidrólise enzimática

A cinética enzimática é a avaliação do mecanismo pelo qual as enzimas ligam substratos e os transformam em produtos. O resultado da curva cinética para os HPPs obtidos a partir da hidrólise de aparas de *Oreochromis niloticus* com o emprego de Alcalase[®], Neutrase[®] e Novo-Pro D[®] está apresentado na Figura 8.

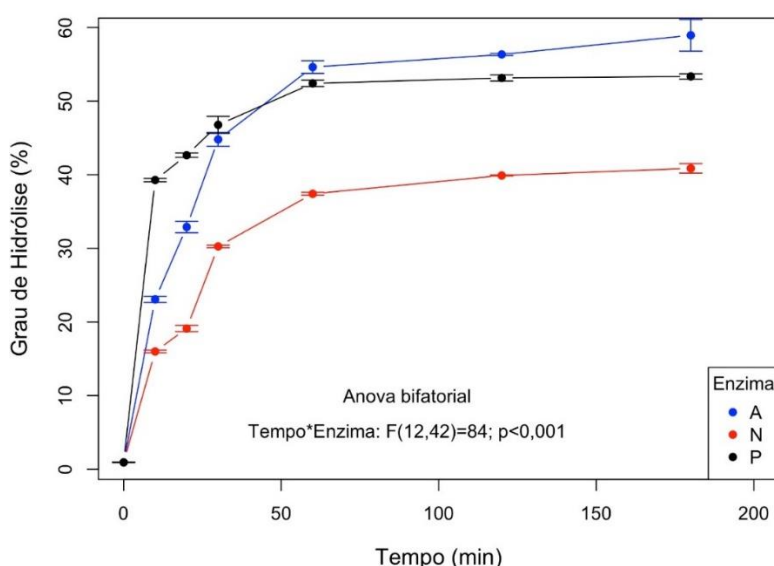


Figura 8 - Cinética do processo de hidrólise dos HPP's elaborados a partir de aparas do filé de *Oreochromis niloticus* com as enzimas Alcalase 2.4 L[®] (A), Neutrase[®] (N) e Novo-Pro D[®] (P).

Verifica-se a interação significativa ($p<0,05$) entre os fatores tempo e enzima sobre o GH. A enzima Novo-Pro D[®] demonstra uma velocidade inicial de reação maior do que as demais enzimas, especialmente nos primeiros 30 minutos de processo, enquanto a enzima Neutrase[®] apresenta uma reação mais lenta e menor GH do produto. A estabilidade do processo de bioconversão é atingida a partir dos 60 minutos pela enzima Novo-Pro D[®] enquanto as enzimas Alcalase[®] e Neutrase[®] atingem seu máximo GH até os 180 e 120 minutos de hidrólise, respectivamente. Analisando a reação em termos de aplicação industrial e os pontos de inflexão da curva com 60 min, pode-se otimizar o

tempo do processo conforme o GH desejado e evitar custos adicionais de operação com baixo rendimento pela redução da velocidade de reação (Maluf et al., 2020). Além disso, elevados tempos de reação favorecem a formação de peptídeos e aminoácidos com característica de amargor, o que tornaria o produto impalatável devido a sua hidrofobicidade residual (Adler-Nissen, 1986; Shen et al., 2012).

Propriedades Funcionais

Solubilidade

Observa-se o efeito de interação significativa ($p < 0,05$) entre pH e enzima sobre a solubilidade dos HPPs ().

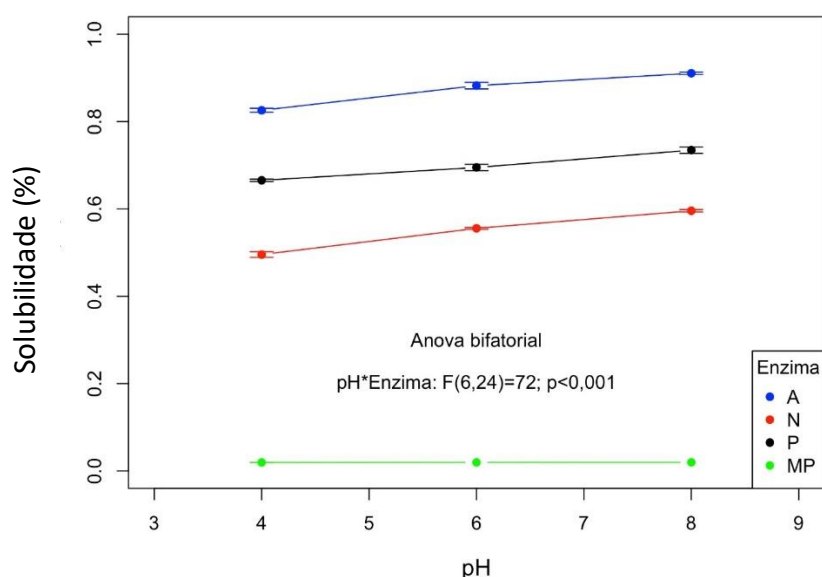


Figura 9 - Solubilidade dos HPP's elaborados a partir de aparas do filé de *Oreochromis niloticus* com as enzimas Alcalase 2.4 L[®] (A), Neutrase[®] (N), Novo-Pro D[®] (P) e matéria prima (MP).

Todos os hidrolisados eram solúveis na faixa de pH estudada, com diferentes percentuais de solubilidade. A solubilidade da proteína hidrolisada está diretamente relacionada ao GH, enzima utilizada, pH, tempo de processo e tipos de substrato (Korkmaz et al., 2021). Quanto maior é o incremento do GH, maior é a solubilidade de um HPP (Amiza et al., 2012). Os resultados indicam maior percentual de solubilidade do HPP desenvolvido a partir da enzima Alcalase 2.4 L[®]. É relatado que a Alcalase 2.4 L[®] permite obter HPPs com melhores propriedades funcionais em relação à Neutrase[®] (N) (Korkmaz et al., 2021).

A alta solubilidade dos HPPs indica aplicações potenciais na indústria de alimentos, já que muitas outras propriedades funcionais como formação e estabilidade de

emulsão e espuma são afetadas positivamente pelo incremento da solubilidade (Taktak et al., 2021).

Interações hidrofóbicas promovem a interação proteína-proteína, resultando na diminuição da solubilidade, enquanto interações iônicas promovem interações proteína-água e resultam em maior solubilidade (Korkmaz et al., 2021). A alta solubilidade da proteína hidrolisada ocorre devido à clivagem da proteína em peptídeos menores que geralmente apresentam solubilidade aumentada (Hassan et al., 2019; Kumoro et al., 2022)

Capacidade de Absorção de Água ($CA_{\text{água}}$)

Neste estudo, observou-se que a $CA_{\text{água}}$ dos HPPs preparados a partir de aparas do filé de *Oreochromis niloticus* com as enzimas Alcalase 2.4 L[®] (A), Neutrase[®] (N) e Novo-Pro D[®] (P) foram significativamente diferentes ($p < 0,05$), como pode ser observado na Figura 10

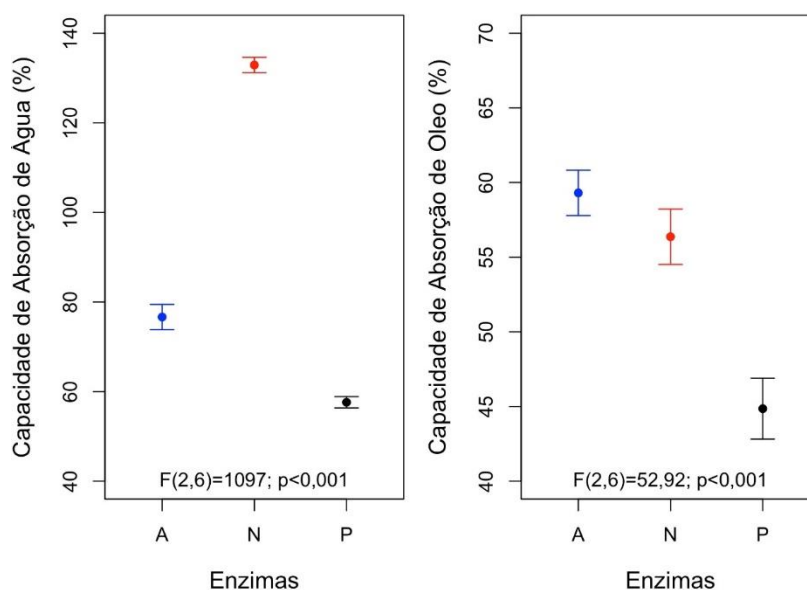


Figura 10 - Absorção de Água ($CA_{\text{água}}$) e Capacidade de Absorção de Óleo ($CA_{\text{óleo}}$) dos HPP's elaborados a partir de aparas do filé de *Oreochromis niloticus* com as enzimas Alcalase 2.4 L[®] (A), Neutrase[®] (N) e Novo-Pro D[®] (P).

O HPP elaborado com a enzima Neutrase[®] apresentou valor de $CA_{\text{água}}$ muito superior em relação às enzimas Alcalase 2.4 L[®] e Novo-Pro D[®]. As propriedades funcionais das proteínas dependem em parte da interação água-proteína e de quão bem a proteína se liga e retém a água um sistema alimentar. A $CA_{\text{água}}$ está relacionada à capacidade da proteína em absorver e reter a água contra a ação da força gravitacional (Shahidi, 1994). Esta capacidade depende da força da matriz proteica do produto, como

a formação de géis, correlacionada positivamente com a força de ligação das moléculas de água (Hassan et al., 2019).

Capacidade de Absorção de Óleo (CA_{óleo})

A CA_{óleo} é uma propriedade funcional importante em ingredientes utilizados em alimentos cárneos e confeitaria. Isso ocorre devido aos efeitos do aprisionamento físico do óleo em combinação com a hidrofobicidade do ingrediente. A hidrofobicidade dos HPPs se desenvolve devido à lise das cadeias proteicas, expondo mais grupos hidrofóbicos internos (Mohanty et al., 2021). As médias dos valores de CA_{óleo} dos HPPs elaborados a partir de aparas do filé de *Oreochromis niloticus* com as enzimas Alcalase 2.4 L[®], Neutrase[®] e Novo-Pro D[®] foram significativamente diferentes ($p < 0,05$). O hidrolisado obtido com Alcalase 2.4 L[®] teve a maior CA_{óleo} entre os demais hidrolisados.

Resultados diferentes destes foram observados em estudo com HPP elaborado a partir de vísceras de *Pangasianodon hypophthalmus*, onde a maior CA_{óleo} foi observada no hidrolisado com menor GH (Hassan et al., 2019). A CA_{óleo} é influenciada por uma série de fatores como, a gordura presente no substrato, o grau de hidrólise e a especificidade da enzima. Esses resultados parecem estar ligados à especificidade das proteínas como substrato para a enzima e ao tempo de processamento, que pode ter exposto a proteína nativa de formas diferentes à clivagem dos peptídeos, formando compostos com capacidade de aprisionamento do óleo e hidrofobicidade diferentes em cada produto.

Higroscopicidade

Como pode ser observado na figura 10, os valores médios de higroscopicidade dos HPPs elaborados a partir de aparas do filé de *Oreochromis niloticus* com as enzimas Alcalase 2.4 L[®], Neutrase[®] e Novo-Pro D[®] apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). O HPP obtido com a enzima Alcalase 2.4 L[®] apresentou o maior valor para higroscopicidade, enquanto a Neutrase[®] proporcionou o menor valor entre as enzimas avaliadas. Mais uma vez, a propriedade em questão é influenciada pela enzima utilizada, tempo de processo, tipo de substrato e hidrofobicidade do produto. Além disso, quanto maior a superfície de contato, maior será o contato com a água. Peptídeos de cadeias

curtas e aminoácidos livres podem apresentar algumas desvantagens como instabilidade química, sabor amargo e alta higroscopicidade sob a influência da temperatura, luz e oxigênio (Taktak et al., 2021). A higroscopicidade de produtos em pó interfere diretamente na estratégia de armazenamento, transporte e embalagem de produtos em larga escala, seja na indústria alimentícia, farmacêutica ou outra. Essa característica está ligada também ao fluxo de materiais granulares e à eficiência de equipamentos destinados ao manuseio destes produtos, influenciando nos fenômenos de deslizamento e aglomeração (Juarez-Enriquez et al., 2017).

Atividade de água (A_w)

Os HPPs não apresentaram diferença significativas para a Atividade de Água (A_w), como apresentado na Figura 11. A atividade de água (A_w) fornece dados importantes, principalmente para definir estratégias de armazenamento e determinação do tempo de prateleira dos produtos. Quanto menor for a A_w , mais lentas serão as reações bioquímicas e com isso, menor mobilidade de atividade enzimática. A A_w pode sofrer alterações conforme o tempo e a temperatura. A um tempo de secagem fixo, a A_w aumenta com a diminuição da temperatura e, quando a temperatura é fixada, a A_w diminui com o aumento de tempo para secagem (Shahidi, 1994).

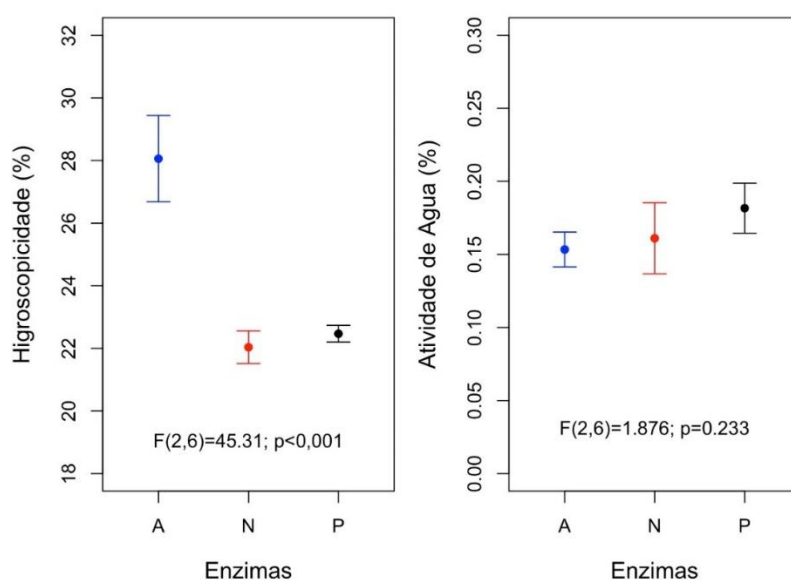


Figura 11 - Higroscopicidade e Atividade de Água (A_w) dos HPP's elaborados a partir de aparas do filé de *Oreochromis niloticus* com as enzimas Alcalase 2.4 L[®] (A), Neutrase[®] (N) e Novo-Pro D[®] (P).

Cor

Os valores de luminosidade (L^*) (variação entre 85,46 a 90,76), a^* (variação entre -5,56 a -4,63) e b^* (variação entre 15,11 a 17,84) de todos os HPPs apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), como apresentado na Figura 12. O HPP obtido com a enzima Novo-Pro D[®] apresentou menor luminosidade em relação as demais HPPs. O brilho mais intenso indica maior retenção da proteína íntegra nos produtos (Foh et al., 2012). Ao mesmo tempo, o valor de esverdeamento (a^*) do HPP obtido com a mesma enzima foi inferior aos demais HPPs. Por outro lado, os valores de amarelecimento (b^*) diferiram significativamente entre si, sendo amarelo mais evidente no HPP obtido com a enzima Novo-Pro D[®], seguida da Alcalase 2.4 L[®], Neutrase[®].

Os valores de luminosidade neste estudo se assemelham aos encontrados para HPPs de *Labeobarbus nedgia* e *Hypophthalmichthys nobilis* obtidos com proteases porém, a^* é levemente inferior e b^* levemente superior no presente estudo. (Alahmad et al., 2022; Tadesse et al., 2023). Fatores que influenciam na cor objetiva dos HPPs são o tamanho da cadeia dos peptídeos e sequência de aminoácidos, o teor de mioglobina e hemoglobina nas diferentes espécies de peixes, os tipos de enzimas empregadas no processo e a proporção entre enzima e substrato (You et al., 2009; Alahmad et al., 2022; Tadesse et al., 2023).

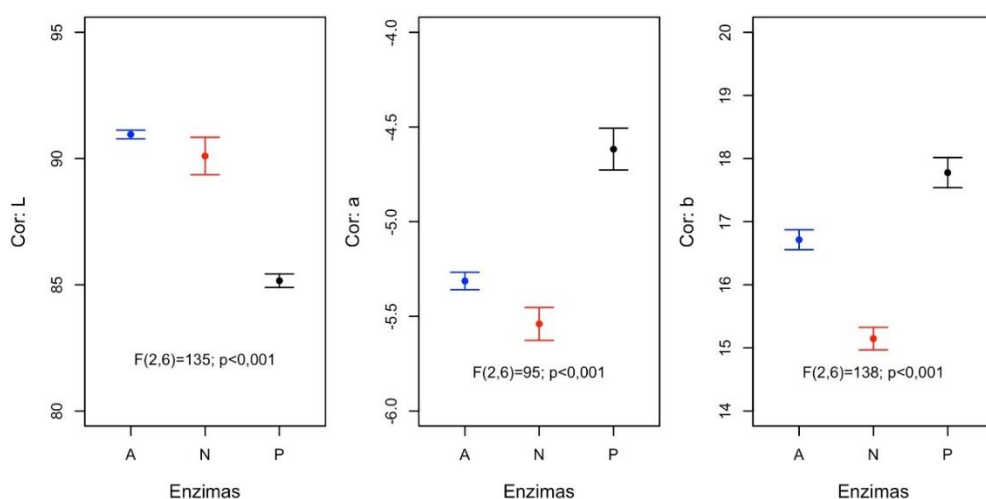


Figura 12 - Perfil de cores dos HPP's elaborados a partir de aparas do filé de *Oreochromis niloticus* com as enzimas Alcalase 2.4 L[®] (A), Neutrase[®] (N) e Novo-Pro D[®] (P).

Caracterização química elementar

O conteúdo de minerais dos HPPs é mostrado na Tabela 5. Observa-se alto teor dos minerais P, K, Ca, Fe, Cu e Zn. Os resultados mostram que os HPPs podem ser fontes de importantes micronutrientes que precisam ser adquiridos através da suplementação alimentar. O valor de Ca observado no HPPs obtido com a enzima Alcalase 2.4 L[®] é bastante inferior aos demais HPPs, enquanto os valores de Mn Fe, Cu, Zn e Se são superiores. Essas diferenças podem ocorrer pelo suposto efeito quelante de compostos formados ao longo do processo de hidrólise.

Tabela 5 - Conteúdo de minerais dos HPPs elaborados a partir de aparas do filé de *Oreochromis niloticus* com as enzimas Alcalase 2.4 L[®], Neutrase[®] e NovoPro D[®].

Elementos	Nome estrutura	Hidrolisado Proteico de Peixe			IDR*
		A (mg)	N (mg)	P (mg)	
P	Fósforo	7360,43	3619,54	3600,45	800 - 1200
K	Potássio	6658,74	9148,82	10425,67	3500
Ca	Cálcio	218,43	879,46	552,61	800 - 1200
Cr	Cromo	<2,78	<2,75	<3,27	0,05 - 0,02
Mn	Manganês	6	<2,25	<2,66	2 - 5
Fe	Ferro	737,08	53,05	33,27	15
Cu	Cobre	45,93	19,26	12,11	1,5 - 3
Zn	Zinco	171,52	23,77	15,7	12 - 15
Se	Selênio	1,28	<0,67	<0,77	0,05 - 0,07

*IDR: Ingestão Diária Recomendada.

Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

Peso molecular

A figura 12 apresenta o resultado do espectro FTIR dos hidrolisados proteicos e da matéria prima. Com base no espectro (Figura 13) pode-se observar as áreas de absorção do grupo amida em 1624 cm⁻¹ (amina I), 1530 cm⁻¹ (amina II) e 1388 cm⁻¹ (amina III). A banda em 2922-2854 cm⁻¹ corresponde a ligação C-H em alcanos. A banda da amida I é determinada pela deformação axial do grupo carbonila C=O em 1744 cm⁻¹. Em contrapartida, a banda da amina II, uma amina secundária (banda de 1570-1515 cm⁻¹), é originada da deformação angular da ligação N-H. A banda da amina III é resultado da deformação axial da ligação C-N e N-H, e também da presença do grupo carbonila C=O (Parker, 1971).

As regiões de absorção das amidas I e II de todos os hidrolisados apresentam uma diferença na banda. Essa discrepância nas bandas pode ser atribuída as diferentes

condições das hidrólises enzimáticas, como a temperatura, tempo de hidrólise, concentração da enzima e na configuração da proteína obtida dos diferentes hidrolisados (Alahmad et al., 2023). Além disso, as bandas da amina I e II são sensíveis a estrutura secundária da proteína, que podem ser afetadas principalmente pelo tipo de enzima e da temperatura do ensaio (Noman et al., 2023). De acordo com Baltacıoglu, Bayındırlı e Severcan (2017), as bandas das aminas I e II podem diminuir com o aumento da temperatura do ensaio.

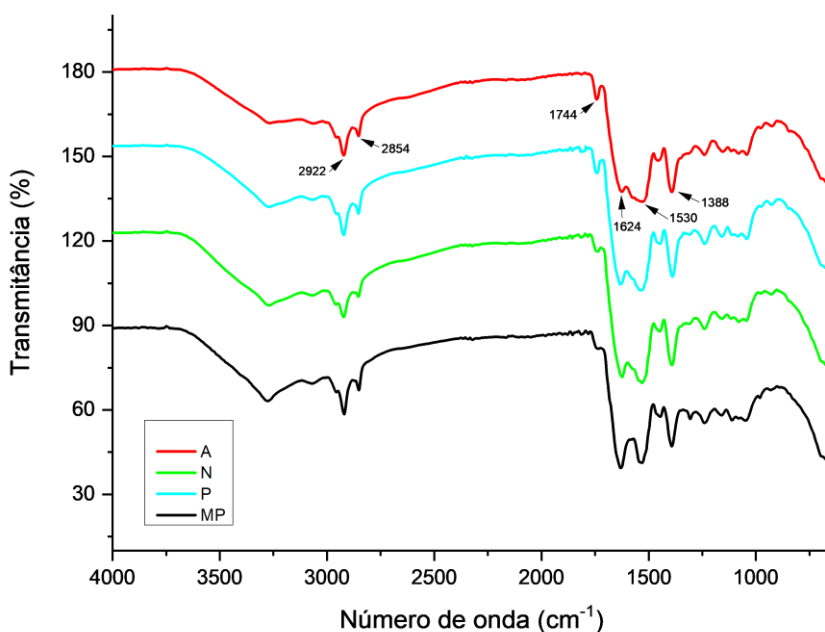


Figura 13 - Espectros FTIR dos HPP's elaborados a partir de aparas do filé de *Oreochromis niloticus* com as enzimas Alcalase 2.4 L[®] (A), Neutrase[®] (N) e Novo-Pro D[®] (P) e matéria prima (MP).

Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A Figura 14 mostra a análise de DSC para as diferentes amostras. A partir do gráfico, é possível observar que as propriedades térmicas da MP foram afetadas pela hidrólise enzimática. A desnaturação de proteínas é observada pelo pico endotérmico no gráfico (Leon et al., 2003), sendo assim, a temperatura de desnaturação (T_p) pode ser utilizada como análise para estabilidade térmica das proteínas (Liu et al., 2020). A T_p da MP obtida pelo DSC foi 72,68°C, enquanto a T_p das hidrólises com as enzimas Alcalase (A), Neutrase (N) e NovoPró D (P) foram de, respectivamente, 69,57°C, 60,62°C e 76,93°C, indicando que a hidrólise da MP feita com a enzima P tem uma melhor estabilidade térmica da proteína em relação aos demais ensaios.

O controle de temperatura, tempo, pH, concentração do substrato e atividade da enzima são importantes fatores para o sucesso da hidrólise enzimática. Entretanto, quando essas condições não são ideais para a enzima e o substrato, ocorrerá a desnaturação da proteína, e assim, o fim da hidrólise (Mora e Toldrá, 2023). Quanto maior for o tempo de tratamento das amostras, menor será a sua temperatura de desnaturação (Batista et al., 2009). A maior temperatura de desnaturação de P indica que os compostos formados pela hidrólise com Novo-Pro D[®] (P) resistem a temperaturas mais altas sem que ocorra a desnaturação da proteína, podendo passar por processos térmicos mais rigorosos na fabricação de alimentos.

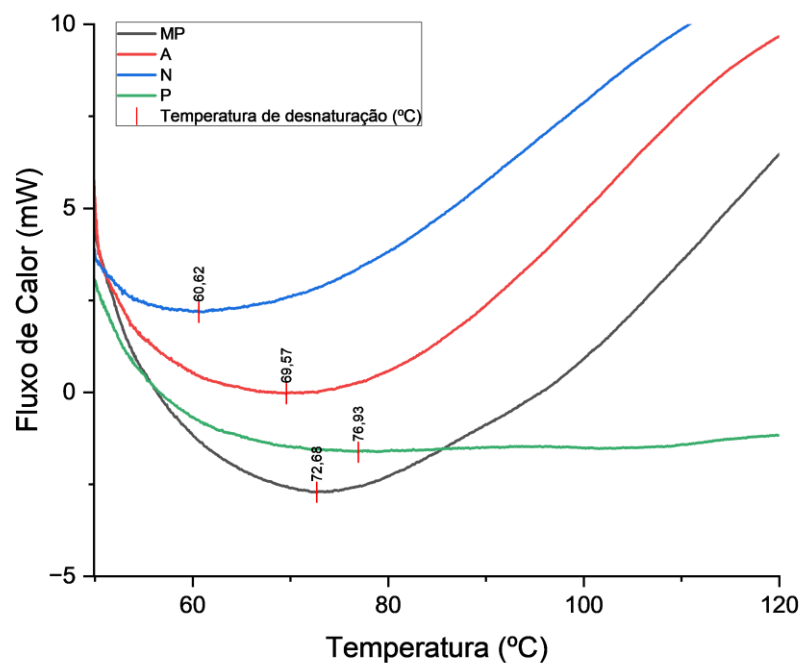


Figura 14 - Curvas de DCS dos HPP's elaborados a partir de aparas do filé de *Oreochromis niloticus* com as enzimas Alcalase 2.4 L[®] (A), Neutrase[®] (N), Novo-Pro D[®] (P) e matéria-prima (MP).

Peso molecular

É observado na Figura 15 que todos os hidrolisados apresentam arraste no gel de separação, demonstrando que os fragmentos formados após o processo de hidrólise possuem tamanho inferior à 14,4 KDa. Estudos relatam que HPPs obtidos com endopeptidases apresentam fragmentos de proteínas nas proximidades da banda de 5 KDa (Kim, 2020).

A matéria prima contém proteínas com peso molecular amplamente distribuídas, variando entre 97 e 20,1 KDa. Isso ocorre pela ação de enzimas endógenas que atuam antes do início do processo de hidrólise, durante os preparativos da matéria prima para os ensaios.

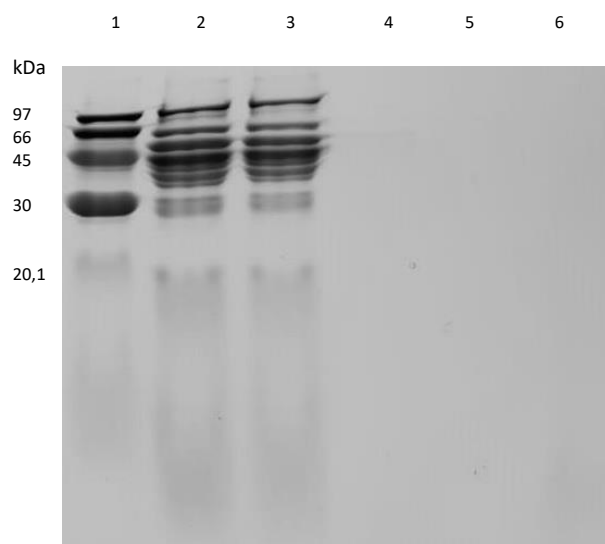


Figura 15 - Distribuição de peso molecular dos HPP's. Faixa 1: controle, faixa 2: matéria prima (2.000 rpm), faixa 3: matéria prima (10.000 rpm), faixa 4: Alcalase 2.4 L[®] em 1 h, faixa 5: Neutrase[®] em 3 h e faixa 6: Novo-Pro D[®] em 2 h.

A distribuição do peso molecular demonstrada em Cromatografia de Camada Delgada (CCD) pode ser observada na . O peso molecular de 0,075 KDa observado na coluna do padrão corresponde à glicina, enquanto o peso molecular de 0,181 KDa corresponde à tirosina.

Os HPP's elaborados a partir de aparas do filé de *Oreochromis niloticus* com as enzimas Alcalase 2.4 L[®], Neutrase[®] e NovoPro D[®] apresentam uma banda forte nas proximidades da glicina, com baixo peso molecular. Enquanto isso, a matéria-prima fica estagnada nas proximidades do peso molecular do BSA (66,43 KDa) e da tirosina. A CCD mostra que todos os HPPs apresentam elevado conteúdo de aminoácidos livres e proteínas de baixo peso molecular, enquanto a matéria prima apresenta proteínas de peso molecular maior.

As análises de distribuição do peso molecular demonstram que proteínas de alto peso molecular estão presentes apenas na composição da matéria prima, e não dos

hidrolisados, os quais apresentam grande quantidade de aminoácidos livres e proteínas de baixo peso molecular.

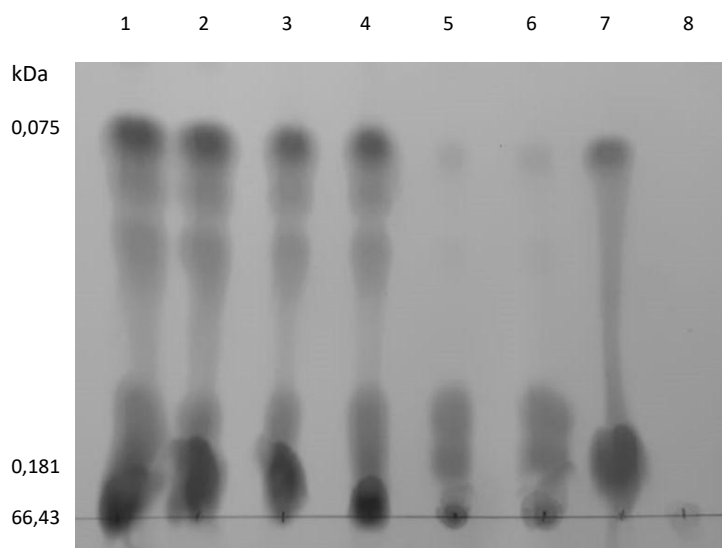


Figura 16 - CCD. 1: Alcalase®, 5000 rpm; 2: Neutrase®, 5000 rpm; 3: Novo-Pro D®, 3000 rpm; 4: Novo-Pro D®, 5000 rpm; 5: Matéria prima, 3.000 rpm; 6: Matéria prima 5.000 rpm; 7: Padrão tirosina e glicina 2mg/500 microlitros; 8: Padrão BSA 1mg/ml (66.43 g/mol).

Quanto maior o GH, maior é o conteúdo de peptídeos de baixo peso molecular. Além disso o baixo peso molecular de peptídeos (<3 kDa) apresentaram maior atividade inibitória de ACE-I e eliminação de radicais DPPH do que peptídeos de alto peso molecular (>10 kDa) (Yathisha et al., 2022).

Conclusões

Os HPPs elaborados a partir de aparas do filé de *Oreochromis niloticus* com as enzimas Alcalase 2.4 L®, Neutrase® e Novo-Pro D® apresentaram características satisfatórias em relação à cinética da reação enzimática, propriedades funcionais, conteúdo de minerais, estabilidade térmica e distribuição do peso molecular. Todos os HPPs demonstraram potencial para a utilização na indústria de alimentos, seja como alimento funcional ou como ingrediente de alto valor biológico para formulações especiais.

O HPP elaborado com a enzima Alcalase 2.4 L[®] se destacou dos demais quanto à solubilidade e teor de minerais. Os HPPs elaborados com as enzimas Alcalase 2.4 L[®] e Novo-Pro D[®] demonstraram melhores resultados na cinética do processo de hidrólise, com a última de destacando em relação à velocidade inicial da reação. Os HPPs elaborados com as enzimas Alcalase 2.4 L[®] e Neutrase[®] apresentaram melhores resultados de luminosidade e de capacidade de absorção de óleo. Os HPPs com as enzimas Neutrase[®] e Novo-Pro D[®] obtiveram melhores resultados de higroscopicidade. O HPP elaborado com a enzima Neutrase[®] se destacou dos demais quanto à capacidade de absorção de água.

Referências bibliográficas

- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzimic hydrolysis of food proteins*. Barking: Elsevier Applied Science, 427 p.
- Alahmad K, Noman A, Xia W, Jiang Q, Xu Y. (2023). Influence of the Enzymatic Hydrolysis Using Flavourzyme Enzyme on Functional, Secondary Structure, and Antioxidant Characteristics of Protein Hydrolysates Produced from Bighead Carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Molecules*. 28(2):519. <https://doi.org/10.3390/molecules28020519>
- AOAC (2016). *Official Methods of Analysis*. (20 ed.). Rockville: AOAC Internacional.
- Baltacıoglu, H., Bayındırlı, A., & Severcan, F. (2017). Secondary structure and conformational ~ change of mushroom polyphenol oxidase during thermosonication treatment by using FTIR spectroscopy. *Food Chemistry*, 214, 507–514. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814616310457>
- BATISTA, T. M.; MARTINS, V.C.A.; PLEPIS, A. M. G. (2009). Thermal behavior of in vitro mineralized anionic collagen matrices. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 95, n. 3, p. 945-949.
- Dias, L. T., & Leonel, M.. (2006). Caracterização físico-química de farinhas de mandioca de diferentes localidades do Brasil. *Ciência E Agrotecnologia*, 30(4), 692–700. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542006000400015>
- Espinoza-Quñones, F. R.; Módenes, A.N.; De Pauli, A.R.; Palácio, S.M. (2015). Analysis of Trace Elements in Groundwater Using ICP-OES and TXRF Techniques and Its Compliance with Brazilian Protection Standards. *Water Air Soil Pollut*, v. 226, n. 32, p. 1-12, february.
- Finkler, J. K.; Piana, P. A.; Fleck, J. F.; Boscolo, W.R.; Feiden, A.; Signor, A.; Fiorese, M.L. (2022). Production of fish protein hydrolysates from *Oreochromis niloticus* fillet trimmings. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 6, e37311629172, (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i6.29172>
- Fritzen-Freire; C. B.; Prudêncio, E. S.; Amboni, R. D. M. C. Pinto, S. S.; Negrão-Murakami, A. B.; Murakami, F. S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray-drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, v. 45, n.1, p. 306-312, jan.

Foh, M. B. K., Qixing, J., Amadou, I. & Xia, W. S. (2012). Influence of ultrafiltration on antioxidant activity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(5), 227-235.

Gao, R., Yu, Q., Shen, Y., Chu, Q., Chen, G., Fen, S., Yang, M., Yuan, L., McClements, D. J., & Sun, Q. (2021). Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 110, pp. 687–699). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.031>

GLÓRIA, M. M.; REGITANO-d'ARCE, M. A. B. (200). Concentrado e isolado protéico de torta de castanha do Pará: obtenção e caracterização química e funcional. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.20, n.2, p.240-245.

Hamed, F., Elgaoud, I., Deracinois, B., Flahaut, C., Nedjar, N., & Barkia, A. (2022). Production of hydrolysates and peptides from a new protein source: *Diplodus annularis*. *Food Bioscience*, 50. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102129>

Hassan, M. A., Deepitha, R. P., Xavier, K. A. M., Gupta, S., Nayak, B. B., & Balange, A. K. (2019). Evaluation of the Properties of Spray Dried Visceral Protein Hydrolysate from *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1978) Extracted by Enzymatic and Chemical Methods. *Waste and Biomass Valorization*, 10(9), 2547–2558. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0302-1>

Hoyle, N. & Merrit, J. H. (1994). Quality of fish protein hydrolysate from herring. *Journal of Food Science*, 1, 4769-4774.

Juarez-Enriquez, E., Olivas, G. I., Zamudio-Flores, P. B., Ortega-Rivas, E., Perez-Vega, S., & Sepulveda, D. R. (2017). Effect of Water Content on the Flowability of Hygroscopic Powders. *Journal of Food Engineering* 205:12–17.

Köhn, C. R., Fontoura, A. M., Kempka, A. P., Demiate, I. M., Kubota, E. H., Prestes, R. C. (2015). Assessment of different methods for determining the capacity of water absorption of ingredients and additives used in the meat industry. *International Food Research Journal*, v. 22, p. 356-362.

Korkmaz, K., Tokur, B., & Uçar, Y. (2021). Production of fish protein hydrolyzate using enzymatic hydrolysis from fish processing wastes. *Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences*, 31(2), 502–513. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.831067>

Kumoro, A. C., WarGHani, D. H., Kusworo, T. D., Djaeni, M., Ping, T. C., & Ma'rifat Fajar Azis, Y. (2022). Fish protein concentrate for human consumption: A review of its preparation by solvent extraction methods and potential for food applications. In *Annals of Agricultural Sciences* (Vol. 67, Issue 1, pp. 42–59). Faculty of Agriculture, Ain-Shams University. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2022.04.003>

LAEMMLI, U. (1970). Cleavage os structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, p. 680-685.

León, A., Rosell, C.M. & Benedito de Barber, C. A (2003). differential scanning calorimetry study of wheat proteins. *Eur Food Res Technol* 217, 13–16. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0699-y>

Liceaga-Gesualdo, A. M. & Li-Chan, E. C. Y. (1999). Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 64, 1000-1004. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb12268.x>

Mora, L. & Toldrá, F. (2023). Advanced enzymatic hydrolysis of food proteins for the production of bioactive peptides, *Current Opinion in Food Science*, Volume 49, n100973, ISSN 2214-7993, <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100973>.

Liu, Lili; Dai, Xiaoning; Kang, Huaibin; Xu, Yunfeng; Hao, Weiming (2020). Structural and functional properties of hydrolyzed/glycosylated ovalbumin under spray drying and microwave

freeze drying. Food Science and Human Wellness, S2213453019301739–doi:10.1016/j.fshw.2020.01.003

Lin, M. J. Y.; Humbert, E. S.; Sosulski, F. W. (1974). Certain functional properties of sunflower meal products. *Journal of Food Science*, v. 39, p. 368-370.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, 265-275.

Maluf, J. U., Fiorese, M. L., Maestre, K. L., Dos Passos, F. R., Finkler, J. K., Fleck, J. F., & Borba, C. E. (2020). Optimization of the porcine liver enzymatic hydrolysis conditions. *Journal of Food Process Engineering*, 43(4). <https://doi.org/10.1111/jfpe.13370>

Mohanty, U., Majumdar, R. K., Mohanty, B., Mehta, N. K., & Parhi, J. (2021). Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysates from visceral waste of *Labeo rohita*. *Journal of Food Science and Technology*, 58(11), 4349–4358. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04915-3>

Morr, C. V. et al. (1985). A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*, v. 50, n. 6, p. 1715-1718.

Noman A, Ali AH, Al-Bukhaiti WQ, Mahdi AA, Xia W (2020). Structural and physicochemical characteristics of lyophilized Chinese sturgeon protein hydrolysates prepared by using two different enzymes. *J Food Sci.* 2020 Oct;85(10):3313-3322. doi: 10.1111/1750-3841.15345. Epub 2020 Jul 22. Erratum in: *J Food Sci.* 2021 Nov;86(11):5041. PMID: 32696987. <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1750-3841.15345>

Parker, F.S. (1971). Amides and Amines. In: *Applications of Infrared Spectroscopy in Biochemistry, Biology, and Medicine*. Springer, Boston, MA. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4684-1872-9_8

Silva, A. E.; Silva, L. H. M.; Pena, R. S. (2008). Comportamento higroscópico do açaí e cupuaçu em pó. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, Campinas, v. 28, n. 4, p. 895-901.

Shahidi, F. (1994) *Frutos do Mar: Química, Processamento, Tecnologia e Qualidade*. Blackie Acadêmico e Profissional, Glasgow. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-2181-5>

SHEN, Q.; GUO, R.; DAI, Z.; ZHANG, Y. (2012). Investigation of Enzymatic Hydrolysis Conditions on the Properties of Protein Hydrolysate from Fish Muscle (*Collichthys niveatus*) and Evaluation of Its Functional Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, n. 20, p. 5192–5198, may.

Tadesse, S. A., Emire, S. A., Barea, P., Illera, A. E., Melgosa, R., Beltrán, S., & Sanz, M. T. (2023). Valorisation of low-valued ray-finned fish (*Labeobarbus neldgia*) by enzymatic hydrolysis to obtain fish-discarded protein hydrolysates as functional foods. *Food and Bioproducts Processing*, 141, 167–184. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2023.08.003>

Taktak, W., Nasri, R., López-Rubio, A., Hamdi, M., Gómez-Mascaraque, L. G., Nasri, M., & Karra-Chaâbouni, M. (2021). Enzymatic Production of Novel European Eel Proteins Hydrolysates: Biological Activities, Techno-Functional Properties and Maltodextrin-Hydrolysates Efficient Electrosprayability. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(2), 1129–1148. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10156-x>

Tonon, R. V.; Brabet, C.; Hubinger, M. D. (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açaí (*Euterpeoleraceae* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, Amsterdam, v. 43, p. 907-914. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.12.013>

Yathisha, U. G., Vaidya, S., & Sheshappa, M. B. (2022). Functional Properties of Protein Hydrolyzate from Ribbon Fish (*Lepturacanthus Savala*) as Prepared by Enzymatic hydrolysis.

International Journal of Food Properties, 25(1), 187–203.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2027964>

Zhang, Z., Gao, P., Jiang, Q., Zhang, Z., Zhang, X., Yang, F., Yu, P., Liu, S., & Wenshui, X. (2023). Optimization of ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) frames yield high-calcium and high-amino acid hydrolysates. *International Journal of Food Properties*, 26(2), 3393–3406. <https://doi.org/10.1080/10942912.2023.2281886>