

UFPB-UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ANGELA LIMA MENÊSES DE QUEIROZ

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADOS
PROTEICOS DE SUBPRODUTOS DO ABATE DE
CAPRINOS

JOÃO PESSOA
2017

ANGELA LIMA MENÊSES DE QUEIROZ

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADOS
PROTEICOS DE SUBPRODUTOS DO ABATE DE
CAPRINOS**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, da
Universidade Federal da Paraíba em
cumprimento aos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Dr.^a Marta Suely Madruga

**JOÃO PESSOA
2017**

Q3o Queiroz, Angela Lima Menêses de.
 Obtenção e caracterização de hidrolisados proteicos de
 subprodutos do abate de caprinos / Angela Lima Menêses de
 Queiroz.- João Pessoa, 2017.
 111f.
 Orientadora: Marta Suely Madruga
 Tese (Doutorado) - UFPB/CT
 1. Tecnologia de alimentos. 2. Caprinocultura. 3. Hidrólise
 enzimática. 4. Concentrados proteicos. 5. Subprodutos.

UFPB/BC

CDU: 664(043)

ANGELA LIMA MENÊSES DE QUEIROZ

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE
SUBPRODUTOS DO ABATE CAPRINO**

Tese APROVADA em 16 / FEVEREIRO /2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Marta Suely Madruga – DEA/CT/UFPB
Orientadora

Prof.^a Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco – ITAL
Examinador Externo

Prof.^a Dra. Mônica Tejo Cavalcanti - UATA/CCTA/UFCG
Examinador Externo

Prof.^a Dra. Tatiane Santi Gadelha – DBM/CCEN/UFPB
Examinador Interno

Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha – DBM/CCEN/UFPB
Examinador Interno

*À Deus, minha mãe, irmãs,
Meu esposo e sobrinhos, pelo apoio
E amor doado.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus que me permitiu alcançar este objetivo, me proporcionando saúde e me dando forças para continuar diante das dificuldades encontradas ao longo deste período.

A minha orientadora Dr^a Marta Suely Madruga pela ajuda, dedicação, conhecimento e tempo doado, experiência e paciência ao me orientar neste trabalho, tão novo para nosso grupo de pesquisa.

Agradeço a Coordenação do Programa em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelas oportunidades concedidas ao longo desses anos, em especial ao Professor Coordenador Flávio Honorato, a Professora Rita de Cássia Queiroga e Lindalva por estarem sempre disponíveis para qualquer esclarecimento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Agradeço ao Instituto de Tecnologia de Alimentos e a Professora Dra Maria Teresa Bertoldo por ter me aceitado na instituição e com as contribuições ao longo do trabalho.

A minha mãe Oliete, que me dá amor, atua como pai e nos ajuda sempre sermos vencedoras e alcançar nossas metas, por isso que me orgulho tanto da sua perseverança e a amo tanto.

Ao meu padrasto Nezomar Ramalho (*in memoriam*) por sempre confiar na minha capacidade intelectual.

A minhas irmãs, Sandra, Giovana, Germana, Simone e Angélica, que são as pessoas mais importantes na minha vida e sem elas eu não saberia ser tão feliz.

Ao meu esposo José Luís, que com seu amor e dedicação infinita, acredita em mim, é meu alicerce e força para continuar lutando e buscando meus sonhos.

Aos meus sobrinhos, Guilherme, Gabriel, Maria Luíza, Vitor, Fernando, Jamille, Maria Clara, Mariana e Júlia, que tanto amo.

As minhas eternas amigas: Inês, Polyana, Dayana, Vanessa, Luciana, Natália, Taliana e Narciza por toda ajuda doada, companheirismo, amizade e confiança.

A todos do grupo de pesquisa, e em especial a Taliana, Narcisa, Ana Rita, Íris, Mércia pela disposição e ajuda na realização das análises do projeto.

A todos que contribuíram com a realização deste projeto.

Obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcuta

RESUMO

QUEIROZ, A. L. M. **Obtenção e caracterização de hidrolisados proteicos de subprodutos do abate de caprinos**. 2017. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba.

O aproveitamento de subprodutos do abate de caprinos para obtenção de hidrolisados proteicos apresenta-se como opção para o aumento da renda do produtor rural, uma vez que as vísceras exibem elevado valor nutricional, com teores de proteínas similares ao da carne caprina. Neste contexto, a presente tese objetivou a obtenção, através da hidrólise enzimática a partir dos sub-produtos do abate de caprinos, um hidrolisado proteico, com propriedades alimentícias e/ou funcionais para ser utilizado direta ou indiretamente na alimentação humana e/ou animal, agregando-se valor aos subprodutos do abate caprino. Um primeiro estudo de composição química foi realizado, para pesquisar as potencialidades de três vísceras caprinas (pulmão, coração e fígado) e de sua mistura na proporção de 1:1:1 para aproveitamento como novos produtos e/ou ingredientes funcionais. Os resultados mostraram que as vísceras caprinas, individuais e em sua mistura, apresentam destacável qualidade nutricional, com elevado teor de proteína (com média de 18 g/100g), excelente perfil de aminoácidos totais, estando presentes todos os aminoácidos essenciais. Foram identificados vinte e dois ácidos graxos, sendo sete saturados, quinze insaturados, com destaque para o C18:2n6t. Os dados analíticos de hidrofobicidade, perfil eletroforético e de aminoácidos totais indicam sua potencialidade para obtenção de hidrolisados proteicos com aplicações tecnológicas. Posteriormente, considerando os resultados da potencialidade da composição química e a inexistência de estudos sobre o aproveitamento de vísceras caprinas em produtos funcionais, realizou-se um segundo estudo, para obter um hidrolisado proteico de vísceras. Neste estudo foi utilizada a mistura de vísceras, as enzimas Alcalase® 2,4L e Brauzyn® em um DCCR². Portanto, as variáveis independentes foram o tempo e a carga enzimática no processo de hidrólise e variável dependente o grau de hidrólise das proteínas. A partir destes estudos foi registrada uma patente BR102015023135-0, e realizada a caracterização química e algumas propriedades funcionais dos hidrolisados que apresentaram maior (> GH) e menor grau de hidrólise (< GH). Os hidrolisados proteicos de vísceras caprinas apresentaram excelente qualidade nutricional, com conteúdo elevado de proteína (16,8 a 22,6 g/100g), perfil de aminoácidos balanceado em aminoácidos essenciais, perfil de hidrofobicidade com característica hidrofílica e reduzido teor de gordura (2,3 a 6,4 g/100g). Os hidrolisados exibiram também propriedades funcionais tecnológicas significativas, tais como solubilidade (valor máximo de 59% no hidrolisado de >GH da Alcalase®), capacidade de retenção de óleo (> 6 ml óleo/g proteínas nos hidrolisados de < GH), propriedade emulsificante (63,2 a 64,8 ml óleo/g proteínas) e estabilidade da emulsão (95,3 a 97,2%). Adicionalmente nos estudos de potencialidade antioxidante foi possível observar maiores percentuais de redução do radical livre ABTS•+ em comparação com os testes que para o radical livre DPPH•. Diante destes resultados, podemos concluir que as vísceras caprinas são ingredientes que apresenta potencial de utilização na fabricação e produção de novos produtos, como os hidrolisados proteicos, que possuem larga aplicabilidade tecnológica, além de agregar valor aos subprodutos do abate.

PALAVRAS-CHAVE: Caprinocultura; Coração; Fígado; Pulmão; Hidrólise enzimática; Concentrados proteicos; Subprodutos.

ABSTRACT

QUEIROZ, A. L. M. **Preparation and characterization of protein hydrolysates edible goat meat by-products.** 2017. Thesis (Post Graduation Program of Food Science and Technology) Federal University of Paraiba, João Pessoa, Paraíba.

The utilization of goat viscera to obtain protein hydrolysates presents itself as an option to increase the income of the rural producer, since the viscera exhibit high nutritional value, with protein content similar to that of goat meat. In this context, the aim of this thesis was to obtain, through the enzymatic hydrolysis of goat viscera, a new product, a protein hydrolyzate, with alimentary and / or functional properties to be used directly or indirectly in human and / or animal feed, Goat slaughter by-products. A first chemical composition study was carried out to investigate the potentials of three goat viscera (lung, heart and liver) and their mixture in a ratio of 1: 1: 1 for use as new functional products and / or ingredients. The results showed that individual and mixed goat viscera present a remarkable nutritional quality, with a high protein content (average of 18 g / 100 g), excellent total amino acid profile, all essential amino acids being present. Twenty-two fatty acids were identified, with seven being saturated, fifteen unsaturated, with emphasis on C18: 2n6t. The analytical data of hydrophobicity, electrophoretic profile and total amino acids indicate its potential to obtain protein hydrolysates with technological applications. Subsequently, considering the results of the potential chemical composition and the lack of studies on the use of goat viscera in functional products, a second study was performed to obtain a protein hydrolyzate of viscera. In this study, the mixture of viscera, Alcalase® 2,4L and Brauzyn® enzymes was used in a DCCR². Therefore, the independent variables were the time and the enzymatic loading in the hydrolysis process and dependent variable the degree of hydrolysis of the proteins. From these studies was registered a patent BR102015023135-0, and carried out the chemical characterization and some functional properties of hydrolysates that presented higher (> GH) and lower degree of hydrolysis (<GH). The protein hydrolysates of goat viscera presented excellent nutritional quality, with high protein content (16.8 to 22.6 g / 100g), balanced amino acid profile in essential amino acids, hydrophilicity profile with hydrophilic characteristic and reduced fat content (2.3 to 6.4 g / 100g). Hydrolysates also exhibited significant technological functional properties, such as solubility (maximum value of 59% in Alcalase® GH hydrolyzate), oil retention capacity (> 6 ml oil / g proteins in <GH hydrolysates), emulsifying property (63.2 to 64.8 ml oil / g proteins) and emulsion stability (95.3 to 97.2%). In addition, in the studies of antioxidant potential, it was possible to observe higher percentages of reduction of free radical ABTS • + in comparison with the tests than for free radical DPPH •. In view of these results, we can conclude that goat viscera are ingredients that present potential for use in the manufacture and production of new products, such as protein hydrolysates, which have wide technological applicability, as well as add val to the by-products of slaughter.

KEY WORDS: By-products; Enzymatic hydrolysis; Heart; Goat breeding; Liver; Lung; Protein concentrates.

LISTA DE QUADRO E ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Enzimas proteolíticas com alta e baixa especificidade e seus efeitos na produção de peptídeos com propriedades emulsificantes.....	23
Figura 2	Fluxograma de desenvolvimento da Tese.....	25
Figura 3	Fluxograma do processo de hidrólise enzimática de vísceras caprinas.....	28
 ARTIGO 1		
Figure 1	Profile of hydrofobicity (A) and electrophoretic profile of the fractions (B) of goat viscera and their mixture.....	62
 ARTIGO 2		
Figure 1	Pareto chart and response surface dependent variable using Alcalase® (A and C) and Brauzyn® (B and D).....	90
Figure 2	Hydrophobicity profile of peptides (A) and the sum of the areas of the peakd (B) the peptides of protein hydrolysates goat by-products.....	91
Figure 3	Functional properties (A) and antioxidant (B) protein hydrolysates of goat by-products. Triplicate experiments. Different lowercase letters indicate significant difference between the enzyme (p <0.01) according to the Tukey test. Different capital letters indicate a significant difference between the degree of hydrolysis (p < 0.01) according to the Tukey test...	92
 PATENTE		
Figura 1	Fluxograma de obtenção do hidrolisado proteico.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Os dez maiores efetivos de rebanho caprino no mundo e sua participação no rebanho mundial de caprinos.....	14
Tabela 2	Matriz de planejamento (DCCR 2 ²) com níveis reais e codificados.....	27
ARTIGO 1		
Table 1	Averages of chemical quality (g/100g sample) and fatty acid profile (g fatty acid/100g sample) of goat viscera and their mixture.....	59
Table 2	Total amino acid profile (mg/g protein) of goat viscera and their mixture.....	61
ARTIGO 2		
Table 1	Central composite rotatable design (2 ²) for the enzymatic hydrolysis of goat by-products, using the Alcalase® and Brauzyn® enzymes.....	87
Table 2	Total amino acid profile (% área) of protein hydrolysates goat by-products (p < 0.01), on dry basis.....	88
Table 3	Free amino acid profile (% area) of protein hydrolysates goat by-products (p < 0.01), on dry basis.....	89

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
	2.1 Caprinocultura.....	14
	2.2 Importância e aproveitamento dos componentes não constituintes da carcaça caprina.....	15
	2.3 Produção de hidrolisados proteicos de subprodutos da indústria cárnea.....	17
	2.4 Propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos e sua utilização na indústria de alimentos.....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
	3.1 Material e delineamento experimental.....	25
	3.2 Enzimas e reagentes.....	26
	3.3 Planejamento experimental.....	26
	3.3.1 Processo de hidrólise enzimática	27
	3.4 MÉTODOS.....	29
	3.4.1 Caracterização dos subprodutos do abate caprino e dos hidrolisados proteicos de vísceras caprinas.....	29
	3.4.2 Estudos das propriedades funcionais e atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de vísceras caprinas.....	31
	3.5 Análise estatística.....	33
	REFERÊNCIAS.....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
	4.1 ARTIGO 1: Potential use of goat by-products to obtain protein hydrolysates.....	42
	4.2 ARTIGO 2: Functional protein hydrolysate from goat by-products: optimization and characterization studies.....	63
	4.3 PATENTE: Processo de obtenção de hidrolisado proteico fracionado preparado a partir de vísceras caprinas.....	93
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107
	ANEXOS.....	108

1. INTRODUÇÃO

Os caprinos são pequenos ruminantes que se destacam por sua excelente adaptabilidade ao meio ambiente, característica esta que permite sua reprodução em pastagens de difícil acesso para outras espécies de ruminantes. No Brasil, a região Nordeste concentra quase 91% da população caprina nacional, com um rebanho de mais de 7.800 mil cabeças, seguido da região Sul com 3,86% do rebanho nacional (IBGE, 2012).

Após o abate, a carcaça caprina é geralmente a única parte considerada com valor comercial, tendo em vista a qualidade nutricional da carne caprina, onde se destacam o baixo teor de gordura, a alta digestibilidade, o elevado teor de proteína, ferro e ácidos graxos insaturados (MADRUGA et al., 2007). Os demais componentes como vísceras, órgãos, sangue, que também são comestíveis, são descartados ou subaproveitados. A utilização ineficiente destes subprodutos do abate se apresentam como um problema econômico para os frigoríficos, além disso a sua eliminação inadequada pode causar doenças e problemas de saúde pública.

O descarte dos subprodutos e resíduos do abate não é uma tarefa simples, especialmente quando a quantidade de material é elevada. Assim sendo, é desejável que os subprodutos sejam processados para transformação e agregação de valor, com utilização subsequente na alimentação humana ou animal, na produção de moléculas funcionais, na elaboração de produtos farmacêuticos, etc. (TOLDRÁ; REIG, 2011).

Observa-se que a indústria vem usando a ciência e a inovação para agregar valor aos subprodutos do abate de animais, aumentando sua rentabilidade. Independentemente do destino final dos subprodutos, faz-se necessário o emprego de ferramentas mais eficazes para analisar suas propriedades e potenciais que possam levar ao desenvolvimento de produtos com inovações tecnológicas.

Em termos gerais, o volume atual de subprodutos do abate animal gerados pelas indústrias processadoras é de aproximadamente 24,5 milhões de toneladas ao ano (MARTÍNEZ-ALVAREZ et al., 2015).

As vísceras caprinas, que compreendem o coração, os pulmões, o fígado, os rins, os intestinos e os estômagos, representam em média 15% a 20% do peso vivo do animal. Este rendimento é considerado extremamente significativo, podendo ser revertido em lucro para o produtor ou frigorífico, se as vísceras forem utilizadas para obtenção de biomoléculas e/ou na produção de hidrolisados proteicos. É fato que as vísceras apresentam excelente valor nutricional (ANDERSON, 1988; HONIKEL, 2011).

com destaque para seu conteúdo proteico, apresentando valores $> 18\%$ (NOLLET; TOLDRÁ, 2011).

A maior parte dos estudos reportados na literatura enfocando o aproveitamento de subprodutos do abate animal, através de processos com hidrólise enzimática, se refere principalmente à utilização de resíduos de pescados, a exemplo do aproveitamento de vísceras do peixe-gato (KLOMKLAO et al., 2013), de resíduos do processamento da tilápia (DIETERICH et al., 2014); de sardinha (*S. pilchardus*) e cavala (*T. mediterraneus*) (MORALES-MEDINA et al., 2016). Alguns trabalhos se referem à obtenção de hidrolisados protéicos a partir de subprodutos do abate bovino (BAH et al., 2016), suíno (PAGÁN et al., 2013), ovino (BHASKAR et al., 2007) e de frangos (LASEKAN et al., 2013). No entanto, nenhum trabalho enfocou a potencialidade do aproveitamento de vísceras caprinas na obtenção de novos ingredientes.

Vale citar que os estudos realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa foram voltados para o aproveitamento de vísceras, sangue e carne de descarte de caprinos na elaboração e caracterização de produtos cárneos processados; dentre estes, citam-se: a elaboração de buchada caprina (COSTA et al., 2005; MADRUGA et al., 2003, 2007; SANTOS et al., 2008; QUEIROZ et al., 2013); de chouriço caprino (SILVA et al., 2013); de mortadela caprina (GUERRA et al., 2011); e de patê caprino (DALMÁS et al., 2011; AMARAL et al. 2015). Contudo, nenhum estudo foi realizado envolvendo o aproveitamento de vísceras caprinas na elaboração de hidrolisados proteicos.

Neste contexto, são dignos de nota a qualidade nutricional e os elevados percentuais de rendimento das vísceras caprinas ($> 15\%$ do peso do animal vivo); tornando claro que estas teriam grande impacto econômico se fossem utilizadas como matéria prima na elaboração de novos ingredientes com aplicação tecnológica e/ou nutricional. Partindo desses indicadores, se optou por desenvolver a presente tese, que teve como objetivo obter, a partir da hidrólise enzimática de vísceras caprinas, um hidrolisado proteico, avaliando-se sua aplicação tecnológica e agregando valor aos subprodutos do abate caprino.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caprinocultura

O rebanho caprino mundial é da ordem de 1 bilhão de cabeças (Tabela 1), com forte concentração na China, que tem o maior efetivo mundial, seguida pela Índia, Paquistão e Nigéria. No Brasil, o efetivo caprino é de aproximadamente 9 milhões de cabeças, ocupando o 22º lugar no ranking mundial (FAOSTAT, 2015).

Tabela 1: Os dez maiores efetivos de rebanho caprino no mundo e sua participação no rebanho mundial de caprinos.

País	Posição	Nº de cabeças	Participação (%)
China	1ª	187.869.000	19,00
Índia	2ª	133.000.000	13,00
Nigéria	3ª	71.000.000	7,00
Paquistão	4ª	66.600.000	6,60
Bangladesh	5ª	55.900.000	5,60
Sudão	6ª	31.029.000	3,00
Etiópia	7ª	29.112.963	2,90
Kênia	8ª	25.430.058	2,50
Irã	9ª	22.120.000	2,20
Mongólia	10ª	22.008.896	2,20
Brasil	22ª	9.000.000	0,90
Demais países		361.815.808	35,00
Mundo		1.006.785.725	100

Fonte: FAOSTAT, 2015.

A Região Nordeste do Brasil detém quase 91% deste rebanho, com maiores concentrações para os Estados da Bahia e Pernambuco (IBGE, 2013). Apenas 3,6% são representados pela Região Sul; 2,4%, pela Sudeste; 1,6%, pela Norte; e 1,0%, pela Centro-Oeste. Segundo IBGE (2013), entre os anos de 2012 e 2013, ocorreu um aumento do efetivo de caprinos em alguns Estados da região Nordeste, como por exemplo a Paraíba, Bahia e Sergipe, sendo mais significativo no Estado de Pernambuco, com exceção para o Piauí, Maranhão e Alagoas. Na Região Sul, só o Estado do Rio Grande do Sul não apresentou redução desse efetivo. Na Região Sudeste, no Estado de Minas Gerais foi registrado a maior queda.

A Região Nordeste, por seu ambiente semiárido (que ocupa quase 70% dessa região), caracterizada pela baixa umidade e pouco volume pluviométrico, além das características geográficas como solo, relevo, clima e vegetação, fez com que a população de animais caprinos aumentasse consideravelmente, devido a sua fácil adaptação a este clima, transformando-a na maior população de caprinos do Brasil, onde a caprinocultura tem lugar de destaque como atividade econômica e social. Devido a estes fatores, a caprinocultura passou a ter lugar de destaque como atividade econômica e social para o produtor local, estando inserida na cultura deste povo. Segundo Madruga; Bressan (2011), os animais produzidos em sistemas extensivos utilizam as regiões mais secas, com baixo potencial para criação de bovinos e/ou para a agricultura; nesse contexto, a produção de carne caprina tem um papel socioeconômico significativo, contribuindo para a biodiversidade do bioma caatinga desta região.

Orsköv (2011), reportou que a carne caprina em geral é muito popular no exterior, onde são utilizadas em festividades religiosas como Páscoa, Natal e Hamadã. No Brasil, é um produto que, melhorando os padrões de produção e disponibilizando outros preparados a partir desta carne, pode-se tornar mais popular nas demais regiões onde seu consumo ainda é considerado baixo; embora seja um produto constante na mesa dos nordestinos, principalmente através dos seus pratos típicos como buchada e sarapatel (MONTEBELLO; ARAÚJO, 2006).

Madruga et al. (2007) enfatizarem que a carne caprina se sobressai dentre as opções de carne vermelha, devido ao seu valor nutricional e qualidade sensorial, os baixos teores de gordura e colesterol, a alta digestibilidade e seus elevados níveis de proteína e ferro. Entretanto, um dos desafios para a caprinocultura está no melhor aproveitamento dos subprodutos do abate de caprinos.

2.2 Importância e aproveitamento dos componentes não constituintes da carcaça caprina

Do abate do animal resultam a carne e os subprodutos, sendo os últimos definidos como tudo que se pode obter de um animal durante o processo de abate com valor econômico, com exceção da carne (YAMAMOTO, 2004). Os subprodutos podem ser classificados em comestíveis ou não. Os comestíveis, a exemplo de vísceras e sangue, que são diretamente destinados à alimentação humana ou para a produção de derivados cárneos, e não comestíveis que são aqueles aproveitados na elaboração de

ração animal, indústria de cosméticos e produtos farmacêuticos, entre outros (TOLDRÁ; REIG, 2011).

Os autores Nollet; Toldrá (2011) mencionam que os subprodutos comestíveis são fontes significativas de nutrientes. Em geral, eles têm um bom valor nutricional, altas quantidades de proteínas e baixos níveis de gordura, como também um bom conteúdo de vitaminas e minerais. O fígado é referenciado como um dos subprodutos mais nutritivos e constitui uma fonte potencial de Vitaminas B12 e A, além de se sobressair pelo aporte de proteínas na sua composição (NOLLET; TOLDRÁ, 2011; MADRUGA et al., 2003); o coração é incluído nos produtos cárneos processados com a finalidade de adicionar proteína em diversos produtos, já que apresenta valores na ordem de 20%, além de melhorar a cor dos produtos (NOLLET; TOLDRÁ, 2011).

Na indústria frigorífica a carne tem seu aproveitamento em cortes de maior valor agregado ou na elaboração de produtos cárneos processados; no entanto um ponto chave para aumentar ou melhorar a eficiência desta indústria está no aproveitamento dos subprodutos do abate (COSTA et al., 2005). Segundo Toldrá et al. (2012), o processamento tecnológico dos subprodutos do abate permite agregação de valor, maior estabilidade relacionada a vida de prateleira, além de contribuir para as funções tecnológicas no qual possam ser empregados; como também melhora a qualidade sensorial (cor, textura, sabor) e proporciona mais conveniência de aquisição e consumo, além de gerar lucro ao produtor.

Em diversos países, os subprodutos do abate de caprinos e ovinos são utilizados como matéria-prima na produção de novos produtos cárneos, que estão associados à cultura local, no qual podemos citar a *Morcilla de Burgos* na Espanha (SANTOS et al., 2003), do *Chouriço Alentejano*, *Chouriço Mouro* e da *Morcela de Assar* em Portugal (ROSEIRO et al., 1998), das *Cavourmas* na Grécia (ARVANITOYANNIS et al., 2000) e dos *Blutwurst* na Alemanha (STIEBING, 1990). No Brasil, foi estudado o potencial de aproveitamento de vísceras e sangue de caprinos na elaboração de diferentes produtos cárneos, a exemplo da *buchada* (MADRUGA et al., 2003, 2007; COSTA et al., 2005; SANTOS et al., 2008; QUEIROZ et al., 2013); *sarapatel* (BRASIL et al., 2014); *chouriço* (SILVA et al., 2013); *mortadela* (GUERRA et al., 2011); e *patê* (DALMÁS et al., 2011; AMARAL et al., 2015).

No Brasil, as vísceras caprinas são muito apreciadas e consumidas, utilizadas principalmente como ingredientes de pratos típicos, podendo a comercialização desses produtos alcançar uma receita adicional de 57,51% em relação ao valor da carcaça (SANTOS et al. 2007). As vísceras podem representar em média 20 % do peso vivo do animal, dentre os subprodutos comestíveis, (COSTA et al. 2005), representando até 10% das proteínas totais dos animais abatidos (HSIEH; OFORI, 2011).

Fatores econômicos também influenciam no consumo destes produtos e determinam sua competitividade no mercado. O valor final está atrelado aos custos operacionais, os equipamentos utilizados no processamento, uso de embalagens adequadas, refrigeração e estocagem. O consumo de órgãos e vísceras também é determinado pelo fornecimento regular no mercado, que está diretamente relacionado com a cultura local, competitividade com relação a produtos semelhantes, aparência e higiene (GOLDSTRAND, 1988).

Os subprodutos de origem animal têm se destacado na indústria de carnes em decorrência do seu potencial de transformação para aproveitamento tecnológico e nutricional, com grande impacto econômico ao setor produtivo. Em termos gerais, o volume atual de subprodutos do abate animal gerados pelas indústrias processadoras é de aproximadamente 24,5 milhões de toneladas ao ano (MARTÍNEZ-ALVAREZ et al. 2015). Segundo Toldrá et al. (2012) o uso eficiente dos subprodutos do abate de bovinos e suínos pode gerar ganhos econômicos totais da ordem de 11,4 % e 7,5%, respectivamente ao setor produtivo, além de se destacarem como fonte de nutriente, principalmente de proteínas, que poderão ser utilizados na produção de hidrolisados proteicos, com a finalidade de aplicação tecnológica, nutricional e industrial afim de melhorar a qualidade do produto final.

2.3 Produção de hidrolisados proteicos de subprodutos da indústria cárnea

O processo de hidrólise tem como resultado a diminuição do peso molecular, aumento do número de grupos ionizáveis e exposição de grupos hidrofóbicos, provocando mudança das propriedades funcionais e conformidade das proteínas.

A hidrólise pode ser catalisada por ácidos, bases ou enzimas. As hidrólises ácida e alcalina são totalmente inespecíficas, podendo destruir aminoácidos como o triptofano, e causar a racemização da maioria dos aminoácidos, comprometendo o valor nutricional da proteína. A catálise enzimática permite que se recupere a enzima, que se trabalhe sob condições brandas, sem que ocorram perdas do ponto de vista nutricional,

nem a formação de reações colaterais indesejáveis, devido a especificidade da enzima (ADLER-NISSEN, 1986). Além disso as enzimas podem ser empregadas, geralmente, em concentrações muito baixas, sendo desnecessária sua remoção (ZAVAREZE et al., 2009).

As enzimas proteolíticas podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana. Algumas apresentam especificidade para ligações peptídicas nas quais participam determinados aminoácidos, enquanto outras agem mais amplamente. As enzimas classificam-se em endo ou exopeptidases, de acordo com o mecanismo de ação. As exopeptidases são enzimas que hidrolisam a proteína nas extremidades N terminais e as endopeptidases hidrolisam a proteína no interior da molécula, geralmente em resíduos específicos (YANG et al., 2011).

A natureza do sítio catalítico da enzima permite outra classificação (ADLER-NISSEN, 1986):

- Serina-proteases: apresentam uma hidroxila no seu centro ativo, incluindo neste grupo a alcalase, quimotripsina, tripsina, elastase, protrombina;
- Cisteína-proteases: são as de origem vegetal (papaína (Brauzyn®), bromelina e ficina), de origem microbiana e de animal e possuem um aminoácido cisteína no sítio capaz de se ionizar;
- Metaloproteases: que contêm um metal, geralmente o zinco;
- Proteases aspárticas: cujo sítio ativo apresenta o grupo carboxila do ácido aspártico, estando entre as principais enzimas deste grupo a renina e a pepsina.

Dentre as proteases, a Alcalase® (*subtilisina Carlsberg*), é uma protease bacteriana produzida a partir do *Bacillus licheniformis*, uma serina protease utilizada na produção de hidrolisados enzimáticos de variadas fontes proteicas de grau alimentício, que cliva muitos tipos de ligações peptídicas, preferencialmente aquelas com cadeia lateral hidrofóbica na porção C – terminal (ADLER-NISSEN, 1986). A Brauzyn®, uma cisteína protease, que apresenta atividade sobre ligações éster e amida e hidrolisam preferencialmente ligações adjacentes aos aminoácidos fenilalanina, valina e leucina.

Segundo Silvestre et al. (2003) e Kumar et al. (2012) o processo de hidrólise enzimática melhora a funcionalidade da proteína em termos de propriedades funcionais, sensoriais, de textura e físico-químicas tais como: solubilidade, poder emulsificante, formação de espuma, gelificação, com aplicabilidade em vários produtos alimentícios, dependendo do substrato proteico, da especificidade da enzima usada e das condições de hidrólise. Diante do exposto, os hidrolisados proteicos podem ser empregados para:

- Implementação e propriedades funcionais;
- Suplementação e obtenção de novos produtos alimentícios;
- Componentes de sabor;
- Redução do potencial alergênico de alimentos.

As enzimas proteolíticas hidrolisam as ligações peptídicas entre aminoácidos, geram uma mistura de peptídeos de peso molecular diferentes e aminoácidos livres (CLEMENTE, 2000). Sua capacidade de hidrolisar um substrato de proteína é altamente variável, sendo essencial a seleção adequada para a produção de compostos com características físico-químicas e nutricional definidas (CLEMENTE, 2000).

A escolha da enzima proteolítica é muito importante, uma vez que sua ação específica irá influenciar a composição final dos produtos da hidrólise, principalmente com relação ao tamanho médio dos peptídeos. Alguns fatores afetam a atividade enzimática (pH, temperatura) e devem ser controlados durante o processo de hidrólise (MURRAY; FITZGERALD, 2007).

O produto resultante da hidrólise enzimática é altamente funcional, e quando utilizado como ingrediente na indústria de alimentos, confere propriedades de gelificação e textura, por exemplo, além de ter uma variedade de aplicações em outros tipos de indústrias, incluindo a farmacêutica, nutrição humana e cosmética (CLEMENTE, 2000).

Segundo He et al. (2013) a hidrólise enzimática apresenta vantagens quando comparadas com a hidrólise ácida e alcalina, tais como: menos amargura, valor nutritivo e baixo teor de sal dos hidrolisados finais, e ainda produzem hidrolisados mais homogêneos.

Pesquisas vêm sendo desenvolvidas objetivando a produção de hidrolisados proteicos de alto valor nutricional de fontes não convencionais de origem animal, a exemplo do fígado, pulmão, coração, rins, cérebro e intestinos uma vez que estes subprodutos são excelentes fontes de peptídeos funcionais, aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais (ARISTOY; TOLDRÁ, 2011; TOLDRÁ et al., 2012). Vale citar que a produção de biomoléculas através da hidrólise enzimática das proteínas melhora o desempenho de importantes atividades biológicas, de acordo com a sequência aminoacídica, direcionando sua aplicação como ingredientes nutracêuticos, além de ampliar o leque de aplicações tecnológicas na indústria de alimentos, como

intensificadores de sabor e emulsionantes (LAFARGA; HAYES, 2014; MORA et al., 2014).

A hidrólise enzimática é uma técnica rápida e segura para a produção de hidrolisados proteicos e de peptídeos de grau alimentar, podendo ser usada para melhorar a expressão das propriedades funcionais e biológicas das proteínas, agregando inovação aos subprodutos de baixo valor comercial (MORA et al., 2014). A hidrólise enzimática apresenta vantagens quando comparadas com a hidrólise ácida e alcalina, dentre estas, a obtenção de hidrolisados proteicos mais homogêneos em relação ao tamanho dos peptídeos gerados com redução de compostos de degradação secundária formados durante o processo; produtos com menor sabor amargo e baixo teor de sal (HE et al., 2013).

A maior parte dos estudos reportados na literatura voltados ao aproveitamento de subprodutos do abate animal, utilizando processos com hidrólise enzimática, se referem principalmente aos resíduos de pescados, a exemplo o aproveitamento de vísceras do peixe-gato no preparo de hidrolisados proteicos que apresentaram elevadas quantidades de aminoácidos essenciais (45,22%) e obtiveram a arginina e lisina como predominantes, além de concluir que estes hidrolisados são uma boa fonte de peptídeos (KLOMKLAO et al., 2013); de resíduos do processamento da tilápia, onde foi desenvolvido o hidrolisado proteico para uso como ração animal. Foram utilizadas as enzimas Alcalase® e Brauzyn® e teve como resultados produtos com potencial aplicação nas indústrias de ração animal, como flavorizante e fonte de nutriente (DIETERICH et al. 2014); de sardinha (*S. pilchardus*) e cavala (*T. mediterraneus*) nos quais foram pesquisadas a utilização desses hidrolisados proteicos para microencapsulação em óleo de peixe. Mostrou-se eficiente na microencapsulação e estabilidade oxidativa do óleo por um período de 12 semanas (MORALES-MEDINA et al. 2016).

Outros poucos trabalhos se referem a obtenção de hidrolisados protéicos de subprodutos do abate bovino (BAH et al. 2016), onde foram utilizadas fontes vegetais para hidrolisar o plasma sanguíneo, no intuito de se estudar as atividades antioxidantes e antimicrobianas *in vitro*. Como resultados, obtiveram hidrolisados com propriedades antioxidantes elevadas e sequências peptídicas únicas; outros autores estudaram basicamente métodos de produção de hidrolisados proteicos a partir do resíduo ósseo do suíno, utilizado para produção de presunto. Foram utilizados reatores variados volumes e estudadas as variáveis do processo de hidrólise. Mostrou ainda como uma alternativa

para o uso de resíduos gerados pela indústria (PAGÁN et al. 2013); BHASKAR et al. (2007) utilizaram a massa visceral do ovino (intestino grosso e delgado) na preparação do hidrolisado proteico, utilizando protease fúngica. Foram observados a presença de alguns aminoácidos essenciais e ainda podem ser aplicados a outros produtos alimentares; LASEKAN et al. (2013) usaram os subprodutos do abate do frango para produção de hidrolisados proteicos e mostraram que estes possuem propriedades bioativas que podem ter várias aplicações como fonte de proteínas e ácidos graxos. Rosa et al. (2002) propuseram estudos envolvendo a utilização de vísceras caprinas ou outros subprodutos, como ingredientes e aromatizantes para produtos cárneos processados. As vísceras representadas pelo coração, pulmões, fígado, rins, intestinos, estômagos, juntamente com o cérebro e o sangue representam em média de 15% a 20% do peso vivo do caprino. Logo, estes percentuais teriam grande impacto econômico, se fossem utilizados como matéria prima na elaboração de novos ingredientes com aplicação tecnológica e/ou nutricional.

2.4 Propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos e sua utilização na indústria de alimentos

Propriedades funcionais são características físico-químicas que influenciam na performance das proteínas em diferentes sistemas alimentares, influenciando também nas suas propriedades sensoriais, durante diferentes estágios do processamento até o consumo (VILLAMIL et al., 2017). Devido ao pH de muitos alimentos estarem próximo ao seu ponto isoelétrico e das proteínas apresentarem boas funcionalidades, estes alimentos têm seu uso limitado na indústria, portanto, a modificação enzimática de proteínas tornou-se uma técnica cada vez mais utilizada na melhoria da sua funcionalidade, por ampliar sua faixa de pH (CHALAMAIAH et al., 2012; HALL et al., 2016; VILLAMIL et al., 2017).

As propriedades funcionais apresentadas pelos hidrolisados proteicos resultantes da hidrólise enzimática, são dependentes de diferentes fatores, como a natureza do substrato, especificidade da enzima usada, condições de hidrólise (KUMAR et al., 2012; PEINADO et al., 2016), sendo necessário que as condições de processo atendam as condições de maior atividade da enzima e, portanto, estritamente definidas.

Segundo De Castro et al., (2015), as propriedades funcionais das proteínas podem ser avaliadas de diversas maneiras, como por exemplo, pela sua afinidade com a

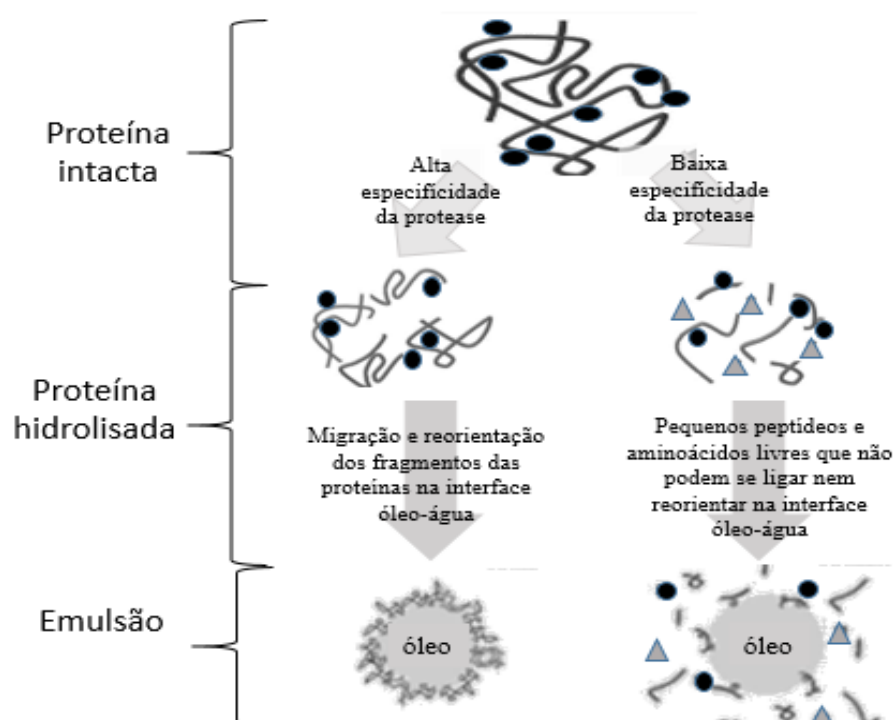
água, pela habilidade de formar ligações cruzadas, pela capacidade das moléculas se unirem e formar uma película, além de interferir na qualidade sensorial dos produtos.

Dentre algumas propriedades funcionais de importância em alimentos, podemos citar:

A *solubilidade* é considerada a funcionalidade mais importante porque ela afeta todas as outras. A quebra das ligações das proteínas em peptídeos menores conduz a produtos mais solúveis, mas nem todos os peptídeos formados vão ter boa solubilidade, o que vai depender da capacidade de solvatação, que é dependente da hidrofobicidade do material (LACOU et al., 2016; VILLAMIL et al., 2017). O grau de hidrólise está diretamente relacionado com a solubilidade, podendo ser explicado porque o longo tempo de hidrólise produz peptídeos de baixo peso molecular gerando maior exposição dos grupos polares e ionizáveis, melhorando sua habilidade de formar pontes de hidrogênio com a água (HE et al., 2013; DE CASTRO et al., 2015). Os autores Liu et al. (2014) e Zavareze et al. (2009) estudando esta propriedade nos hidrolisados proteicos de pescados obtiveram valores entre 80% e 40% de solubilidade, respectivamente. Schmidt; Salas-Mellado (2009) reportam que o aumento da hidrofilicidade dos hidrolisados é resultante dos grupos amino e carboxila ionizáveis dos aminoácidos que foram expostos durante a hidrólise da proteína, melhorando assim a solubilidade do produto, como também dos demais grupos polares não ionizáveis.

A *capacidade emulsificante* é definida como a habilidade do material em formar emulsão, e estabilidade da emulsão, definida como a capacidade de manter a emulsão formada (WITONO et al., 2016). É uma propriedade funcional primária em proteínas alimentícias, pois estas estão relacionadas com a capacidade das proteínas em diminuir a tensão superficial entre os componentes hidrofílicos e hidrofóbicos, sendo muito importante para produtos cárneos (De CASTRO et al., 2015). Zavareze et al. (2009), ao avaliar esta propriedade em hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*), utilizando diferentes proteases, puderam verificar a eficiência da enzima Alcalase® obtendo melhores resultados tanto para a capacidade emulsificante, quanto para sua estabilidade.

Na Figura 1 esquematiza como processo de hidrólise extensa pode produzir grandes quantidades de aminoácidos livres e peptídeos de cadeia curta que diminuem o poder emulsificante das proteínas.



Fonte: De Castro et al., 2015, Adaptado.

Figura 1: Enzimas proteolíticas com alta e baixa especificidade e seus efeitos na produção de peptídeos com propriedades emulsionantes. As bolinhas pretas são porções hidrofóbicas e os triângulos cinzas são aminoácidos livres.

A capacidade de formação de espuma de uma proteína, está relacionada com a expansão do volume através do batimento, aeração ou agitação da fase aquosa com uma fase gasosa, provocando propriedades sensoriais específicas. Alguns fatores interferem nesta propriedade, como por exemplo, a natureza da enzima, solubilidade e estado de desnaturação da proteína, presença de sais ou aditivos (FENNEMA et al., 2010).

Capacidade de retenção de óleo, que segundo Zavareze et al. (2009) e Villamil et al. (2017) é uma importante característica funcional e de grande interesse nas indústrias de alimentos, processamento cárneos e confeitaria. Refere-se a quantidade de óleo absorvido e retido, e pode ser afetado pela densidade aparente da proteína, que quanto maior for, maior será o poder de absorção do óleo. Esta propriedade é essencial na aplicação de produtos à base de carne e em produtos onde se deseja a absorção de gordura (KRISTINSSON, RASCO, 2000). Halim et al., (2016) relatam que a absorção da gordura resulta no aprisionamento do óleo e esta habilidade dos peptídeos tem influencia no sabor dos produtos, ocasionando uma ampla e variada aplicabilidade na indústria alimentícia.

Atividade antioxidante, a atividade pela captura do radical livre DPPH[•] e pelo método ABTS^{•+}, determinam a capacidade do substrato em transferir elétrons ou átomos de hidrogênio, que podem reagir com os radicais livres para formar compostos mais estáveis (Morales-Medina et al., 2016). Hidrolisados proteicos que apresentem esta propriedade funcional são muito desejáveis, pois podem ser aplicados em produtos alimentícios com a finalidade de estender a sua vida útil (He et al., 2013). A atividade antioxidante avaliada pelos dois sistemas confere capacidade de estabilizar o componente lipídico no alimento, como também estender sua conservação (Herpandi et al., 2011).

Qian et al., (2008) mencionam que os aminoácidos livres apresentam caráter ácidos e básicos, como por exemplo o ácido aspártico e a histidina, respectivamente, e por possuírem o grupo carboxílico e amino nas cadeias laterais, são queladores de íons metálicos e doadores de hidrogênio. Além destes, os aminoácidos tirosina, metionina, triptofano, lisina e cisteína são exemplos de aminoácidos que possuem característica antioxidante (WANG et al., 2005). Outros, que possuem o grupo aromático em sua cadeia, como por exemplo fenilalanina e tirosina, podem contribuir em doar elétrons, e com isto melhorar a propriedade de sequestro do radical (RAJAPAKSE et al., 2005).

Devido ao exposto, os hidrolisados proteicos são excelentes coadjuvantes na indústria de alimentos, podendo ser adicionado a diversos produtos com a finalidade de melhorar seu conteúdo nutricional, bioativo, como também funcional.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material e delineamento experimental

Vísceras caprinas (fígado, coração e pulmão) foram utilizadas na presente tese que objetivou a obtenção de um hidrolisado proteico com propriedades funcionais tecnológicas. O trabalho foi realizado em três etapas conforme apresentado na Figura 2.

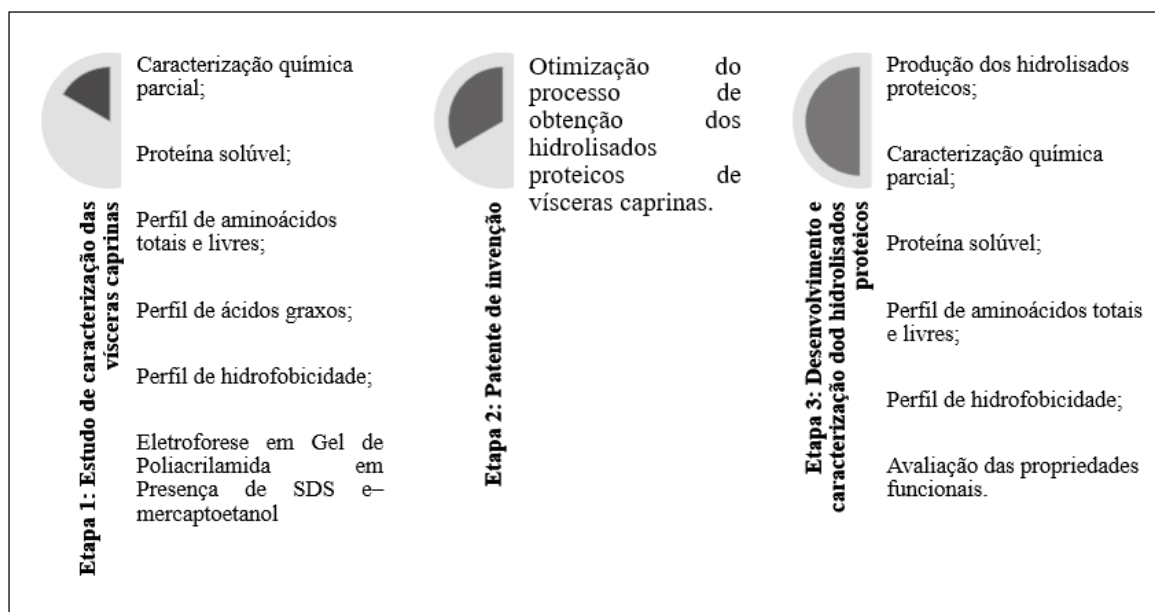


Figura 2: Fluxograma de desenvolvimento da Tese.

As vísceras caprinas foram obtidas em um fornecedor local, situado no Mercado Público Central da cidade de João Pessoa (Paraíba, Brasil). As vísceras caprinas foram coletadas logo após o abate, acondicionadas sob refrigeração ($2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), transportadas para o laboratório de análise química de alimentos, do Centro de tecnologia da Universidade Federal da Paraíba (LAQA, CT, UFPB) onde foram lavadas, pesadas, trituradas em um processador de carnes (CAF Máquinas, modelo 5, São Paulo, Brasil), homogeneizadas e acondicionadas sob congelamento ($-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) até a realização das análises e/ou utilização para obtenção de hidrolisado proteico, observando-se um período de armazenamento não superior a 60 dias. Nos estudos de caracterização das vísceras caprinas (etapa 1) e de produção dos hidrolisados proteicos foram analisadas as vísceras individualmente e uma mistura de vísceras (fígado, coração e pulmão) obtida na proporção de 1:1:1 (peso em massa).

O primeiro estudo envolveu a exploração das potencialidades de aproveitamento das vísceras caprinas em produtos com aplicação tecnológica. Para tanto foram realizadas determinações químicas relativas à caracterização química parcial, perfil de aminoácidos totais, hidrofobicidade, eletroforético e de ácidos graxos. Após realizou-se um estudo do processo de hidrólise enzimática para obtenção de hidrolisado proteico de vísceras caprinas, no qual foi utilizado um planejamento fatorial (etapas 2 e 3) para se definir a melhor condição (concentração de enzima e tempo de hidrólise) de obtenção do hidrolisado proteico de vísceras caprinas. Finalizando-se os estudos com a caracterização e aplicação tecnológica do hidrolisado proteico de vísceras, o qual resultou no registro de uma patente.

3.2 Enzimas e reagentes

As enzimas utilizadas no processo de hidrólise foram a Alcalase® 2,4L (Novozymes Latino Americana Ltda, Paraná, Brasil) e Brauzyn® (Prozyn Biosolutions, São Paulo, Brasil), cedidas pelos fabricantes. A alcalase é uma enzima produzida a partir da fermentação submersa do *Bacillus licheniformis*, o qual contém a subtilisina como protease dominante (SCHMIDT, SALAS-MELLADO, 2009; LI et al., 2016). A brauzyn é uma protease de cisteína, produzida a partir do látex de fruta da papaia, que tem especificidade mais ampla do que tem proteases pancreáticas (LI et al., 2016).

Os reagentes e produtos químicos utilizados para as análises nesta tese foram adquiridos por fornecedores laboratoriais (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany).

3.3 Planejamento Experimental

No estudo do processo de hidrólise enzimática para obtenção de hidrolisado proteico de vísceras caprinas, que foi realizado nos laboratórios do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL – SP), no Laboratório do Centro de ciências e qualidade de alimentos (CCQA) e Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no Laboratório de Alimentos e nutrição, utilizou-se a ferramenta de um planejamento fatorial, através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , com quatro pontos fatoriais (níveis ± 1), três pontos centrais (nível 0) e quatro pontos axiais (níveis $\pm \alpha$), totalizando 11 experimentos para cada uma das enzimas utilizadas. Como variáveis independentes foram consideradas o tempo e a carga enzimática no processo de hidrólise, e como variável dependente o grau de hidrólise das proteínas (Tabela 2).

Tabela 2: Matriz de planejamento (DCCR 2²) com níveis reais e codificados

Ensaio (Hidrolisados)	Tempo (min)	Carga enzimática (μL)
1	- 1 (60)	- 1 (112)
2	- 1 (60)	+ 1 (336)
3	+ 1 (180)	- 1 (112)
4	+ 1 (180)	+ 1 (336)
5	-α (35)	0 (168)
6	+α (205)	0 (168)
7	0 (120)	-α (89)
8	0 (120)	+α (406)
9	0 (120)	0 (168)
10	0 (120)	0 (168)
11	0 (120)	0 (168)

A partir dos resultados obtidos no estudo do processo de hidrólise enzimática foram selecionados quatro hidrolisados proteicos, sendo dois de cada enzima, considerando-se o maior e o menor grau de hidrólise. Estes hidrolisados foram caracterizados quimicamente (composição centesimal, proteína solúvel, perfil de aminoácidos totais, perfil de aminoácidos livres e análise de hidrofobicidade) e determinadas suas propriedades funcionais (capacidade emulsificante, solubilidade, capacidade de retenção de óleo, capacidade antioxidante).

3.3.1. PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A Figura 3 representa o fluxograma do processo de hidrólise enzimática da mistura de vísceras caprinas. As condições de utilização das enzimas Alcalase® e Brauzyn® foram aquelas fornecidas pelos fabricantes, de acordo com as especificações de atividade ótima de cada enzima; isto é pH 7,0 e temperatura ótima de 60 °C para Alcalase®; pH 6,5 e temperatura ótima de 70 °C para Brauzyn®,

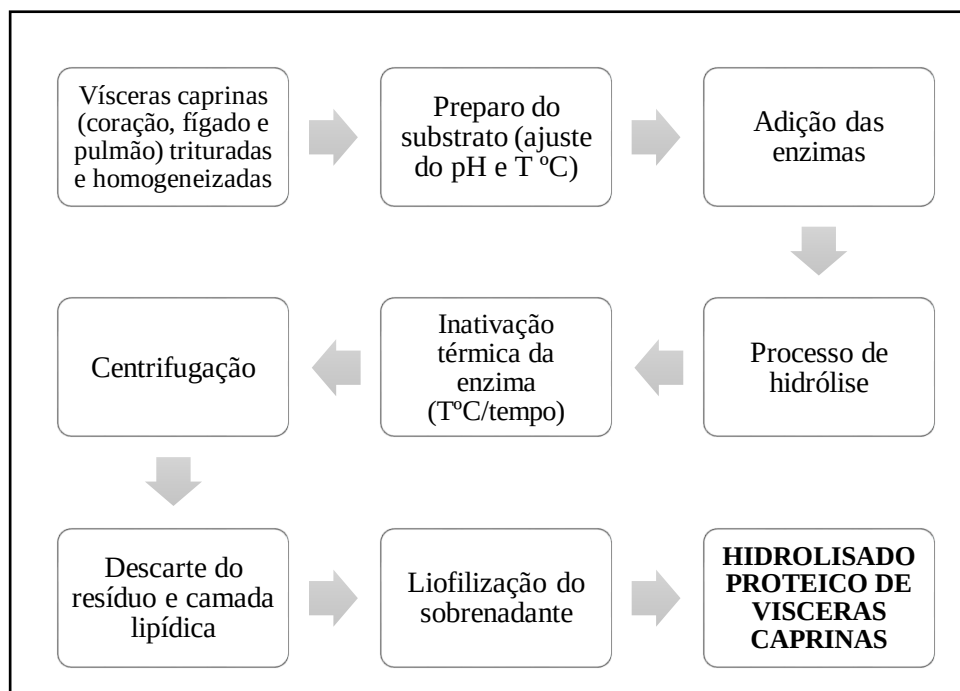


Figura 3: Fluxograma do processo de hidrólise enzimática de vísceras caprinas.

A mistura de vísceras caprinas foi homogeneizada em água deionizada (1:2 p:v) e colocada em um reator de vidro de parede dupla acoplado no equipamento pH Stat - Titulador Automático modelo DL 50 Grafix (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Suíça), com sistema de agitação e o aquecimento realizado por meio de um banho termostatizado conectado ao reator. Durante a reação de hidrólise, o pH foi mantido constante através da adição da solução de NaOH (0,24 mol/l) e o consumo de base monitorado pelo equipamento. O grau de hidrólise (GH) foi definido pela Equação 1 (ADLER-NISSEN, 1986):

$$GH(\%) = B \times N_b \times (1/\alpha) \times (1/MP) \times 1/h_{tot} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

Em que: GH (%) = grau de hidrólise; B = consumo de base em mL; N_b = normalidade da base; $1/\alpha$ = média de grau de dissociação do grupo $\alpha\text{-NH}_2$; MP = massa da proteína em g; h_{tot} = número total de ligações peptídicas no substrato proteico – 7,6 para carnes (ADLER-NISSEN, 1986).

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Caracterização dos subprodutos do abate caprino e dos hidrolisados proteicos de vísceras caprinas

- **Caracterização química parcial:** Os teores de umidade, cinzas e proteínas foram determinados utilizando a metodologia descrita nos itens nº 926.07B, 923.03 e 930.25, respectivamente, da AOAC (2010). O extrato etéreo foi determinado seguindo os procedimentos descritos por Folch, Less, Stanley (1957).

- **Proteína solúvel:** o teor de proteína solúvel foi obtido segundo metodologia descrita por Lowry et al. (1951).

- **Perfil de aminoácidos totais:** Foi quantificado de acordo com o método descrito por White; Hart; Fry, (1986), no qual os aminoácidos foram determinados em amostra previamente hidrolisada em ácido clorídrico bidestilado 6 mol/L. seguida de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC). A separação dos derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) foi realizada em cromatógrafo líquido de alta resolução (VARIAN, Waters 2690, California, USA) acoplado com coluna de fase reversa C18 (PICO-TAG, 3,9 x 150 mm). As fases móveis empregadas consistiram de um tampão acetato de concentração 0,0011 g/mL e pH 6,4 e, uma solução de acetonitrila a 60%. A injeção da amostra (20 µL) foi efetuada manualmente e a detecção ocorreu a 254 nm. A separação cromatográfica foi realizada a um fluxo constante de 1mL/min, à temperatura de 35 °C. O tempo de corrida cromatográfica foi de 21 minutos. A curva de calibração foi construída com nove pontos, traçando-se um gráfico das alturas dos picos obtidos pela injeção da solução de aminoácido preparada numa faixa de 0,1875 µmol/mL a 0,25 µmol/mL. Em cada curva de calibração, o primeiro ponto correspondeu ao limite de quantificação nas condições empregadas, ou seja, a menor quantidade detectável pelo método.

- **Perfil de aminoácidos livres:** Inicialmente os aminoácidos livres foram extraídos mediante a agitação orbital por 60 minutos, com ácido clorídrico 0,1 M (g mL⁻¹) seguida de derivação em pré-coluna com fenilisotiocianato (PITC), de acordo com

White, Hart, Fry (1986) e Hagen, Frost, Augustin (1989). A separação dos derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) foi realizada em cromatógrafo líquido de alta resolução (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) em coluna de fase reversa C18 - Luna - Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m; Phenomenex Inc., Torrence, CA, USA). As fases móveis empregadas consistiram de um tampão acetato de pH 6,4 e uma solução de acetonitrila a 40%. A injeção da amostra foi efetuada automaticamente (50 μ L) e a detecção ocorreu a 254 nm. A separação cromatográfica foi realizada a um fluxo constante de 1 mL/min, à temperatura de 35 °C. O tempo de corrida cromatográfica foi de 45 minutos e os resultados foram expressos em mg de aminoácido por 100 g de amostra, em que a quantificação foi realizada mediante a adição do padrão interno ácido α -aminobutírico.

- **Perfil de hidrofobicidade:** Foi realizado de acordo com Bezerra et al. (2016), com adaptação. 1 g de cada amostra foi diluída em 10 mL de água MiliQ e agitada em mini turrax por 3 minutos, seguidas de centrifugação e filtração em membrana de celulose 0,45 μ m. A análise foi realizada em cromatógrafo líquido de alta resolução (VARIAN, Waters 2690, California, USA) acoplado com coluna de fase reversa C18 (NOVA-PAK 4,6x250 mm cartridge) e partículas de 4 μ m (WATERS – IRLANDA). O volume de injeção foi de 20 μ L, utilizando-se um gradiente da fase móvel estabelecido como: solvente A 98,925% de água, 0,075% de TFA (ácido trifluoroacético) e 1% de acetonitrila (v/v). Após o equilíbrio da coluna por 30 minutos com 100% de tampão A. Os peptídeos foram eluídos em gradiente linear de 0 a 100% de tampão B. O fluxo foi isocrático em 0,5 mL/min.

- **Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e-mercaptoetanol:** Foi realizado utilizando-se a técnica descrita por Laemli (1970). O gel de aplicação (stacking gel) foi preparado na concentração de 4% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 e SDS a 1%, enquanto que o gel de separação (main gel) foi montado na concentração de 15% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 3M, pH 8,8 e SDS a 1%. As amostras foram dissolvidas (10 mg proteína/1mL) em tampão redutor, pH 6,8, (Tris-HCl 0,5 M, 10% de SDS, 10% de glicerol, 5% β - mercaptoetanol e 0,1% azul de bromofenol) e submetidas a 90 °C por 15 min. A corrida foi realizada sob amperagem constante (25mA) e ao final da corrida, o gel foi retirado da placa e fixado em TCA 12,5% por uma hora, sendo então corado com Coomassie brilliant blue R-250 a 0,005%.

Alíquotas de 10 µL foram colocadas em cada poço. A remoção do excesso de corante foi realizada com o auxílio de uma solução descorante de metanol, ácido acético e água (1:3,5:8 v/v/v).

- **Perfil de ácidos graxos:** A transesterificação direta dos ácidos graxos presentes nas amostras de vísceras caprinas foi realizada a partir do método descrito por de O'Fallon et al. (2007). A identificação e quantificação dos ésteres de ácidos graxos foi realizada utilizando-se um cromatógrafo gasoso (HP Hewlett Packard 6890 Series GC Siystem), acoplado com coluna capilar de sílica fundida polar (Supelco, USA) com dimensões de 100 m x 0,25 mm 0,2 µm de espessura do filme. Foi utilizado o hélio como gás de arraste (vazão de 1 mL/min) e os gases hidrogênio e ar sintético na chama no detector. A temperatura inicial do forno foi de 40 °C por 2 minutos, com rampa de 10 °C/ minuto até 180 °C, mantendo-se nesta temperatura por 30 minutos, seguido da rampa de 10 °C/ minuto até atingir a temperatura de 240 °C permanecendo nesta temperatura por 34 minutos, totalizando 86 minutos de corrida. A temperatura do injetor foi mantida em 250 °C e a do detector em 260 °C. Alíquotas de 1,0 µL do extrato esterificado foram injetadas em injetor tipo Split/Splitless, com split de 1:50. Os cromatogramas foram registrados em *software* tipo *EZChrom (Elite Versão 3.3.2 SP2 Agilent, EUA, 2005-2010)*. Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos das amostras com padrões Supelco ME19-Kit (*Fatty Acid Methyl Esters C4-C24*). Os resultados dos ácidos graxos foram quantificados e expressos em mg/100g, utilizando o ácido graxo C19:0 como padrão interno.

3.4.2 Estudos das propriedades funcionais e atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de vísceras caprinas

- **Solubilidade protéica:** Foi determinada utilizando-se o método de Morr et al. (1985), para tanto 500 mg do hidrolisado proteico foram homogeneizadas com 2 mL de solução de NaCl 0,1 mol/l, adicionada de 40 mL de tampão fosfato em pH 7. Em seguida a suspensão foi agitada por 45 minutos, utilizando-se um agitador magnético, e transferida para um balão volumétrico de 50 mL, tendo seu volume completado. A suspensão foi centrifugada a 1008 G por 30 minutos e a quantificação das proteínas solúveis no sobrenadante foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951.) A porcentagem de proteína solúvel foi calculada de acordo com a Equação 2.

$$P.S (\%) = \left(\frac{A \cdot 50}{W \cdot \frac{S}{100}} \right) * 100 \quad (\text{Eq.2})$$

onde: P.S = teor de proteínas solúveis presentes na amostra [%]; A = concentração proteica do sobrenadante [mg/mL]; W = peso da amostra [mg]; S = concentração de proteína na amostra [%].

- **Capacidade de retenção de óleo (CRO):** Foi determinada de acordo com o método de Fonkwe; Singh (1996), onde um grama do liofilizado proteico foi homogeneizada em 20 mL de óleo vegetal e submetida a agitação por 10 minutos em agitador magnético. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 9072 G por 15 minutos. O resultado foi expresso em volume de óleo retido pela quantidade de proteína total presente na amostra.

- **Capacidade emulsificante (CE):** Foi obtida segundo a metodologia descrita por Dench et al. (1981) com modificações, onde 500 mg da amostra foi pesada, homogeneizada em 1 mL de solução salina (NaCl) a 3,5% e agitada durante 10 minutos. Em seguida foi adicionado 5 mL de óleo de soja e agitado novamente por mais 1,5 minutos. A emulsão resultante foi centrifugada a 2800 G por 3 minutos. O resultado foi expresso pela relação da camada emulsificada e altura total.

- **Estabilidade da emulsão:** Para a determinação da estabilidade da emulsão foi necessário aquecer a amostra emulsificada em banho-maria a 80 °C por 30 minutos, resfriá-la em água corrente por 15 minutos e centrifugá-la a 252 G por 15 minutos. A estabilidade de emulsão foi expressa em porcentagem da relação entre a altura da camada emulsificada remanescente e altura total da amostra.

- **Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical Livre DPPH[•]:** A atividade do radical-eliminação DPPH[•] foi determinada utilizando o método proposto por Brand-Williams et al. (1995). Alíquotas (50 a 100 µl) dos liofilizados proteicos foram colocada em cubeta, e adicionado 3,15 mL de 72 µM de solução metanólica do radical DPPH[•]. As medições de absorvância foram iniciadas imediatamente para o branco, sem adição de amostra. As amostras preparadas foram incubadas durante 30 minutos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. O percentual

do decréscimo na absorvância foi medido pela concentração e a capacidade de sequestrar radicais livres foi calculada com base no decréscimo da absorvância observada em relação ao branco no tempo zero. A leitura da absorvância foi realizada a 517 nm em espectrofotômetro UV visível (Quimis®, Modelo Q798U). A capacidade de sequestrar radical livre foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical, calculado conforme a Equação 3:

$$\% \text{ Inibição} = \left(\text{ADPPH} - A \frac{A_m}{A_{\text{Trolox}}} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

onde, ADPPH é a absorvância da solução de DPPH e AAm/Trolox é a absorvância da amostra ou padrão em solução. AAm/Trolox é calculada com base na diferença da absorvância da solução de amostra em teste com o seu branco.

- **Determinação da atividade antioxidante total pelo método ABTS^{•+}**: A atividade total pelo método ABTS^{•+} foi determinada utilizando o método proposto por Re et al. (1999). Alíquotas de 100 µl das amostras foram adicionadas em tubos de ensaio, juntamente com 900 µl de Radical ABTS^{•+}, diluído em álcool etílico até obtenção de absorvância entre 0,7 e 0,8 nm, cujo preparo foi realizado a partir da reação de solução estoque de ABTS 7 mM e persulfato de potássio 140 mM por 12 a 16 horas. Os tubos foram homogeneizados, o espectrofotômetro foi zerado com álcool etílico, sendo realizadas as leituras do branco aos 0 minutos e das amostras após 6 minutos de repouso a 734 nm em espectrofotômetro UV visível (Quimis®, Modelo Q798U). A capacidade de sequestrar radicais livres foi calculada a partir da porcentagem de inibição, com base no decréscimo da absorvância em relação ao branco no tempo zero.

3.5 Análise estatística

A análise estatística dos resultados da caracterização das vísceras caprinas foi realizada por meio de Análise de Variância (ANOVA), em delineamento inteiramente casualizado (DIC), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, utilizando o programa SAS Institute (2014).

Os resultados obtidos no planejamento experimental DCCR 2² foram avaliados por análise de variância (ANOVA) utilizando o software Statistic versão 5.0

(STATSOFT, 1995), onde a partir desse, foram estimados os efeitos das variáveis e determinados os coeficientes dos modelos para a resposta experimental. Toda a análise estatística foi realizada ao nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

A análise de variância Two-way (ANOVA) foi utilizada para avaliar os dados de caracterização e propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos de vísceras caprinas, utilizando o software Statistical Analysis System (versão 11.0) (SAS, 2014).

REFERÊNCIAS

- ADLER-NISSEN, J. A review of food hydrolysis specific areas. *Enzymic hydrolysis of food proteins*, p. 57-109, 1986.
- ANDERSON, B.A. *Composition and nutritional value of edible meat by-product*. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. (Eds.), *Advances in Meat Research*. New York: Elsevier Applied Science, v. 5, p. 15-45, 1988.
- AMARAL, D. S., SILVA, F. A. P., BEZERRA, T. K. A., ARCANJO, N. M. O., GUERRA, I. C. D., DALMÁS, P. S., MADRUGA, M. S. Effect of storage time and packaging on the quality of lamb pâté prepared with variety meat. *Food Packaging and Shelf Life*, v. 3, p. 39-46, 2015.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. 2010.
- ARISTOY, M. C., TOLDRÁ, F. *Essential Amino Acids*. In L. M. L. Nollet; F. Toldrá, (Eds.), *Handbook of analysis of edible animal by-products*. New York: CRC Press, p. 123-135, 2011.
- ARVANITOYANNIS, I.S.; BLOUKAS, J.G.; PAPPA, I.; PSOMIADOU, E. Multivariate data analysis of cavourmas – a Greek cooked meat product. *Meat Science*, v. 54, p. 71–75, 2000.
- BAH, C. S. F.; BEKHIT, A. EL-DIN A.; MCCONNELL, M. A.; CARNE, A. Generation of bioactive peptide hydrolysates from cattle plasma using plant and fungal proteases, *Food Chemistry*, v. 213, p. 98-107, 2016.
- BHASKAR, N., MODI, V. K., GOVINDARAJU, K., RADHA, C., LALITHA, R.G. Utilization of meat industry by products: Protein hydrolysate from sheep visceral mass, *Bioresource Technology*, v. 98, p. 388–394, 2007.
- BEZERRA, T. K. A.; ARAÚJO, A. R. R.; NASCIMENTO, E. S.; PAZ, J. E. M.; GADELHA, C. A. A.; GADELHA, T. S.; PACHECO, M. T. B.; QUEIROGA, R. C. R. E.; OLIVEIRA, M. E. G.; MADRUGA, M. S. Proteolysis in goat “coalho” cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, v. 196, p. 359-366, 2016.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Science and Technology*, v. 28, p. 25–30, 1995.
- BRASIL, L., QUEIROZ, A., SILVA, J., BEZERRA, T., ARCANJO, N., MAGNANI, M., SOUZA, E., MADRUGA, M. Microbiological and Nutritional Quality of the Goat Meat By-Product “Sarapatel”, *Molecules*, v. 19, p. 1047-1059, 2014.
- CHALAMAIAH, M.; KUMAR, B. D.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, v. 135, p. 3020-3038, 2012.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition, *Trends in Food Science & Technology*, v. 11, p. 254- 262, 2000.

COSTA, R.G.; MADRUGA, M.S.; SANTOS, N.M.; MEDEIROS, A.N. Qualidade físico-química, química e microbiológica da buchada caprina. *Higiene Alimentar*, v. 19, n. 130, p. 62-68, 2005.

DALMÁS, P.S.; BEZERRA, T.K.A.; MORGANOB, M.A.; MILANIB, R.F.; MADRUGA, M.S. Development of goat pâté prepared with variety meat. *Small Ruminant Research*, v. 98, p. 46-50, 2011.

DE CASTRO, R. J. S.; BAGAGLI, M. P.; SATO, H. H. Improving the functional properties of milk proteins: focus on the specificities of proteolytic enzymes. *Current Opinion in Food Science*, v. 1, p. 64-69, 2015.

DENCH, J. E.; RIVAS, R. N.; CAYGILL, J.C. Selected functional properties of sesame (*Sesamun insicum* L.) flour and two protein isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 32, p. 557-564, 1981.

DIETERICH, F.; BOSCOLO, W. R.; BERTOLDO, M. T. P.; SILVA, V. S. N.; GONÇALVES, G. S.; VIDOTTI, R. M. Development and characterization of protein hydrolysates originates from animal agroindustrial by products. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, v.1, n. 2, 2014.

FAO. *Food Agriculture Organization*. 2015. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 17 de Fevereiro de 2016.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S.A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, v. 226, p. 497-509, 1957.

FONKWE, L. G.; SINGH, R. K. Protein Recovery from Mechanically Deboned Turkey Residue by Enzymic Hydrolysis. *Process Biochemistry*, v. 31, p.605-616, 1996.

GOLDSTRAND, R.E. *Edible meat by-products: Their production and importance to the meat industry*. In: PEARSON, A. M.; DUTSON, T. R. *Edible Meat By-product*. London: Elsevier, cap. 1, p. 1-13, 1988.

GUERRA, I.C.D.; FÉLEX, S.S.S.; MEIRELES, B.R.L.M.; DALMÁS, P.S.; MOREIRA, R.T.; HONÓRIO, V.G.; MORGANO, M.A.; MILANI, R.F.; BENEVIDES, S.D.; QUEIROGA, R.C.R.E.; MADRUGA, M.S. Evaluation of goat mortadella prepared with different levels of fat and goat meat from discarded animals. *Small Ruminant Research*, v.98, p.59-63, 2011.

HAGEN, S.R.; FROST, B; AUGUSTIN, J. precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. *Journal Assoc. Off. Analyses Chemical*, v.72, p. 912-916, 1989.

HALIM, N. R. A.; YUSOF, H. M.; SARBON, N. M. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 51, p. 24-33, 2016.

HALL, F. G.; JONES, O. G.; O'HAIRE, M. E.; LICEAGA, A. M. Functional properties of tropical banded cricket (*Gryllodes sigillatus*) proten hydrolysates. *Food Chemistry*, In Press, Corrected Proof, Available online 27 November 2016.

HE, S.; FRANCO, C.; ZHANG, W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP), *Food Research International*, v. 50, p. 289-297, 2013.

HERPANDI, N. H.; ROSMA, A.; NADIAH, W. A. W. The tuna fish industry: a new outlook on fish protein hydrolysates. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 10, p. 195-207, 2011.

HONIKEL, K. O. *Composition and calories*. In: L. M. L. Nollet; F. Toldrá (Eds.), *Handbook of analysis of edible animal by-products*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. p. 105-121, 2011.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Distribuição percentual do efetivo de caprino*. Disponível em: <<http://ibge.gov.br>>. Acesso em: 17 de fevereiro de 2016.

KLOMKLAO, S.; KISHIMURA, H.; BENJAKUL, S. Use of viscera extract from hybrid catfish (*Clarias microcephalus* x *Clarias gariepinus*) for the production of protein hydrolysate from toothed ponyfish (*Gazza minuta*) muscle. *Food Chemistry*, v. 136, p.1006-1012, 2013.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry*, v. 36, p. 131-139, 2000.

KUMAR, N. S. S.; NAZEER, R. A.; GANESH, R. J. Functional properties of protein hydrolysates from different body parts of horse mackerel (*magalapis cordyla*) and croaker (*otolithes ruber*), *Mediterranean Journal Nutrition Metabolism*, v. 5, p. 105-110, 2012.

LACOU, L.; LEONIL, J.; GAGNAIRE, V. Functional properties of peptides: from single peptide solutions to a mixture of peptides in food products. *Food Hydrocolloids*, v. 57, p. 187-199, 2016.

LAEMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAFARGA, T.; HAYES, M. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients, *Meat Science*, v. 98, p. 227-239, 2014.

LASEKAN, A.; BAKAR, F. A.; HASHIM, D. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources, *Waste Management*, v. 33, p. 552-565, 2013.

LI, Y.; YU, J.; Goktepe, I.; AHMEDNA, M. The potential of papain and alcalase enzymes and process optimizations to reduce allergenic gliadins in wheat flour. *Food Chemistry*, v. 196, p. 1338-1345, 2016.

LIU, Y.; LI, X.; CHEN, Z.; YU, J.; Wang, F., Wang, J. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. *Food Chemistry*, v. 151, p. 459-465, 2014.

- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. C. Protein measurements with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MADRUGA, M. S.; REZER, J. S.; PEDROSA, N. A.; MELO, H. M. G. Caracterização química e microbiológica de vísceras caprinas destinadas ao preparo de buchada e picado. *Revista Nacional da Carne*, n. 316, p. 36-45. 2003.
- MADRUGA, M. S.; SOUSA, W. H.; MENDES, E. M. S.; BRITO, E. A. Carnes caprinas e ovinas: Processamento e fabricação de produtos derivados. *Tecnologia e Ciência Agropecuária*, v. 1, p. 61-67, 2007.
- MADRUGA, M. S.; BRESSAN, M. C. Goat meats: Description, rational use, certification, processing and technological developments. *Small Ruminant Research*, v. 98, p. 39-45, 2011.
- MARTINEZ-ALVAREZ, O.; CHAMORRO, S.; BRENES, A. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. *Food Research International*, v. 73, p. 204-212, 2015.
- MONTEBELLO, N. de P.; ARAÚJO, W. M. C. *Carne & Cia*. Brasília: Editora Senac – DF, v. 1, 2006.
- MORA, L.; REIG, M.; TOLDRÁ, F. Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food Research International*, v. 65, p. 344-349, 2014.
- MORALES-MEDINA, R. et al. Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray drying. *Food Chemistry*, v. 194, p. 1208-1216, 2016.
- MORR, C.V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. M.; VAN BUREN, J.P.; KILARA, A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*, v. 50, p. 1715-1718, 1985.
- MURRAY, B. A.; FITZGERALD, R. J. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design*, v. 13, p. 773–791, 2007.
- NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F. *Introduction. Offal meat: Definitions, regions, cultures, generalities*. In: L. M. L. Nollet; F. Toldrá (Eds.), *Handbook of analysis of edible animal by-products*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, p. 3–11, 2011.
- O'FALLON, J. V.; BUSBOOM, J. R.; MELSON, M. L.; GASKINS, C. T. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to went meat tissues, oils and feedstuffs. *Journal Animal Science*, v. 85, p. 1511-1521, 2007.
- OFORI, J. A.; HSIEH, Y. –H. P. Blood-derived products for human consumption. *Revelation and Science*, v. 1, p. 14-21, 2011.
- ORSKOV, E.R. Goat production on a global basis. *Small Ruminant Research*, v. 98, p. 9-11, 2011.

PAGÁN, J.; IBARZ, A.; FALGUERA, V.; BENÍTEZ, R. Enzymatic hydrolysis kinetics and nitrogen recovery in the protein hydrolysate production from pig bones, *Journal of Food Engineering*, v. 119, p. 655-659, 2013.

PEINADO, I.; KOUTSIDIS, G.; AMES, J. Production of seafood flavor formulations from enzymatic hydrolysates of fish by-products. *LWT – Food Science and Technology*, v. 66, p. 444-452, 2016.

QIAN, Z. J.; JUNG, W. K.; KIM, S. K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 1690-1698, 2008.

QUEIROZ, A. L. M.; BRASIL, L. M. S.; SILVA, J.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L.; MADRUGA, M. S. Microbiological and nutritional quality of “buchada caprina”, an edible goat meat by-products. *Small Ruminant Research*, v. 115, p. 62-66, 2013.

RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; JUNG, W. K.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Purification of radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, v. 38, p. 175-182, 2005.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; MIN YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

ROSA, G. T.; PIRES, C. C.; SILVA, J. H. S.; MOTTA, O. S. Proporções e Coeficientes de Crescimento dos não-Componentes da Carcaça de Cordeiros e Cordeiras em Diferentes Métodos de Alimentação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, p. 2290-2298, 2002.

ROSEIRO, L. C. et al. *Influence of packaging and storage temperature on cured pork blood sausage shelf-life*, in: Proceedings of the 44th International Congress of Meat Science and Technology, 30 August – 4 September, Barcelona, p. 430–431, 1998.

SANTOS, E. M.; GONZÁLES-FERNÁNDEZ, C.; JAIME, I.; ROVIRA, J. Physicochemical and sensory characterization of Morcilla de Burgos, a traditional Spanish blood sausage. *Meat Science*, v. 65, p. 893-898, 2003.

SANTOS, N. M.; COSTA, N. M.; MEDEIROS, A. N.; MADRUGA, M. S.; QUEIROGA, R. C. R. E. *Buchada Caprina*: características físico-químicas e microbiológicas. Areia-PB: UFPB/CCA, 2007.

SANTOS, N. M.; COSTA, R. G.; MADRUGA, M. S.; MEDEIROS, A. N.; ALBUQUERQUE, C. L. C.; QUEIROGA, R. C. R. E. Constitution and Composition Chemistry of the Precooked Goat like *Buchada* Produced in the State of Paraíba, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 51, p. 793-798, 2008.

SAS INSTITUTE. *User's Guide to Statistics*. Version 11.0. North Carolina State University, Car, 2014.

SCHMIDT, C. G.; SALAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. *Química Nova*, v. 32, p. 1144-1150, 2009.

SILVA, F.A.P., AMARAL, D.S., GUERRA, I.C.D., DALMÁS, P.S., ARCANJO, N.M.O., BEZERRA, T.K.A., BELTRÃO FILHO, E.M., MOREIRA, R.T., MADRUGA, M.S. The chemical and sensory qualities of smoked blood sausage made with the edible by-products of goat slaughter. *Meat Science*, v. 94, p. 34-38, 2013.

SILVESTRE, M.P.C.; SILVA, V.D.M. Functional properties of bovine plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *Food Science and Technology*, v. 37, p. 709-718, 2003.

STATSOFT. *Statistica* [software]. Versão 5.0. Tulsa: Statsoft, 1995.

STIEBING, A. Blood sausage technology. *Fleischwirtschaft*, v.70, p.424-428, 1990

TOLDRÁ, F.; REIG, M. Innovations for healthier processed meats. *Trends in Food Science and Technology*, v. 22, p. 517-522, 2011.

TOLDRÁ, F. et al. Innovations in value-addition of edible meat by-products. *Meat Science*, v. 92, p. 290-296, 2012.

Toldrá, F., Mora, L. Reig, M. New insights into meat by-product utilization. *Meat Science*, v. 120, p. 54-59, 2016.

VILLAMIL, O.; VÁQUIRO, H.; SOLANILLA, J. F. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. *Food Chemistry*, v. 224, p. 160-171, 2017.

WANG, W.Y.; DE MEJIA, E.G. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews Food Science Food Safety*, v. 4, p. 65-78, 2005.

WITONO, Y., TARUNA, I., WINDRATI, W. S., AZKIYAH, L., NORMA, T. Wader (*Rasbora jacobsoni*) Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, v. 9, p. 482-92, 2016.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry*, v. 8, p. 170-177, 1986.

YAMAMOTO, S. M.; MACEDO, F. A. F.; MEXIA, A. A.; ZUNDT, M.; SAKAGUTI, E. S.; ROCHA, G. B. L.; REGAÇONI, K. C. T.; MACEDO, R. M. G. Rendimento dos cortes e não-componentes das carcaças de cordeiros terminados com dietas contendo diferentes fontes de óleo vegetal. *Ciência Rural*, v. 34, n. 6, p. 1909-1913, 2004.

YANG, B.; YANG, H.; LI, J.; LI, Z.; JIANG, Y. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. *Food Chemistry*, v. 124, p. 551–555, 2011.

ZAVAREZE, E.; SILVA, C. M.; SALLAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. *Química Nova*, v. 32, p. 1739-1743, 2009.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com o desenvolvimento desta tese proporcionaram a elaboração de dois artigos científicos e uma patente:

ARTIGO 1: POTENTIAL USE OF GOAT BY-PRODUCTS TO OBTAIN PROTEIN HYDROLYSATES.

Submetido ao periódico LWT – Food Science and Technology, Qualis A2 Periódicos
Capes/Área Ciência de Alimentos

ARTIGO 2: FUNCTIONAL PROTEIN HYDROLYSATE FROM GOAT BY- PRODUCTS: OPTIMIZATION AND CHARACTERIZATION STUDIES.

Submetido ao periódico Food Bioscience, Qualis A1 Periódicos Capes/Área Ciência de
Alimentos

PATENTE DE INVENÇÃO: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO FRACIONADO PREPARADO A PARTIR DE VÍSCERAS CAPRINAS.

Número definitivo: BR102015023135-0, depositada dia 08 de setembro de 2015, no
INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial).

ARTIGO 1

POTENTIAL USE OF GOAT BY-PRODUCTS TO OBTAIN PROTEIN HYDROLYSATES

POTENTIAL USE OF GOAT BY-PRODUCTS TO OBTAIN PROTEIN HYDROLYSATES

Angela Lima Menêses de Queiroz¹, Ana Rita Ribeiro de Araújo¹, Maria Teresa Bertoldo Pacheco², Marta Suely Madruga^{1*}

¹Post-Graduate Program in Food Science and Technology, Department of Food Engineering, Technology Centre, Federal University of Paraiba, 58051-900, Joao Pessoa, Paraiba, Brazil.

²Institute of Food Technology (ITAL), Applied Chemistry and Nutrition Center, 13073-001, Campinas, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author: Phone: +55 (83) 3216-7576, Fax: +55 (83) 3216-7119

E-mail: msmadruga@uol.com.br

ABSTRACT

Currently, consumers show high interest in foods with properties that offer health benefits, which are known as functional foods. Thus, the objective of this research is to study the potential use of goat by-products to obtain new ingredients, such as protein hydrolysates, that can be incorporated into other foods, thus improving their nutritional and/or technological quality. The results obtained in this study showed that goat by-products exhibited remarkable nutritional value, with a high protein content (mean of 18 g/100 g of sample) and an excellent total amino acid profile. Twenty-two fatty acids were identified, of which seven were saturated, eight were monounsaturated and seven were polyunsaturated, including C18:2n6t (0.07 to 0.33 g fatty acid/100 g of sample). It was concluded that goat by-products are ingredients of potential use in the production of

new foods, such as protein hydrolysates, which have broad technological applicability in addition to increasing the economic value of slaughtering by-products.

KEYWORDS: Added value, Goat products, Quality, By-products.

1. INTRODUCTION

Research on new sources of functional ingredients and/or novel products has been the focus of studies that aim to convert the by-products of slaughterhouses as well as meat and fishery processing industries (Mora et al., 2014, Zhang et al., 2010). Among the functional ingredients obtained from the wastes of these industries, protein hydrolysates and bioactive peptides are the most commonly exploited (Klomklao et al., 2013; He et al., 2013; Dieterich et al., 2014; Morales-Medina et al., 2016).

It is a fact that the industry benefits from science and innovation in adding value to animal slaughtering by-products, thus significantly improving their profitability. Generally, the current amount of animal slaughtering by-products generated by processing industries is approximately 24.5 million tons per year (Martínez-Alvarez et al., 2015). Regardless of the final destination of these by-products, it is necessary to apply more efficient tools to value their nutritional potential and identify compounds with functional properties as well as novel technological applications (Toldrá et al., 2012).

The non-carcass components of goat viscera such as the heart, lungs, liver, kidneys, intestines and stomach as well as the brain and blood account for 15% to 20% of the live weight of the animal (Costa et al., 2005; Santos et al., 2007). Such percentages would have great economic impact for slaughterhouses if part of these by-products were utilized as a raw material to produce new ingredients or to obtain a processed product.

Generally, goat viscera are used solely in traditional dishes, including *buchada* or *sarapatel* in Brazil (Queiroz et al., 2013; Brasil et al., 2014), *morcilla de burgos* in Spain (Santos et al., 2003) and *cavourmas* in Greece (Arvanitoyannis et al., 2000), despite being excellent sources of proteins, fats and minerals (Anderson, 1988; Honikel, 2011; Nollet & Toldrá, 2011).

Previous studies evaluated the potential use of goat slaughterhouse by-products in the production and characterization of processed meat products such as bologna (Guerra et al., 2011), pâtés (Dalmás et al., 2011; Amaral et al., 2015), blood sausages (Silva et al., 2013) and *buchada* (Costa et al., 2005, Madruga et al., 2003, 2007; Queiroz et al., 2013). However, the potential use of goat viscera and slaughtering waste in obtaining new ingredients has not been studied. Kirton et al. (1995) and Rosa et al. (2002) proposed studies that focus on the use of goat by-products and other by-products as ingredients and flavoring in processed meat foods.

Considering the limited use of goat viscera, the lack of information on their chemical quality and the need for novel technological alternatives for their use, the present study has the objective of analyzing the some goat by-products composition (heart, liver and lungs) and demonstrating their potential use as new products and/or ingredients that can be incorporated into processed meats, thus increasing their nutritional and/or technological quality.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Raw material

Goat by-products (liver, lungs and heart) used in this study were obtained from the Central Public Market of the city of João Pessoa (Paraíba State, Brazil). By-products were collected, transferred to polyethylene bags and transported under temperature-

controlled conditions ($2^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) to the laboratory. Samples were rinsed with chlorinated water to remove dirt, weighed, ground using a food processor (CAF Máquinas, model 5, São Paulo, Brazil), homogenized and stored in polyethylene bags in commercial freezers ($-10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) for up to 45 days until analysis.

In the present study, the potential use of some goat by-products in technological applications was investigated, where goat viscera were analyzed both individually and as a 1:1:1 mixture of liver, lungs and heart (in weight). Chemical characterization was performed to determine the composition percentages, total amino acid profile, hydrophobicity profile, electrophoretic profile and fatty acid profile.

2.2 Analytical methods

- *Percentages*: Chemical composition as the moisture, ash and protein contents were determined using methods 926.07B, 923.03 and 930.25, respectively, according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2010). Ether extracts were determined as described by Folch et al. (1957).

- *Fatty acid profile*: Direct transesterification of fatty acids from goat viscera was performed as described by O'Fallon et al. (2007). Ester identification and the quantification of fatty acid esters were performed using a gas chromatograph (HP Hewlett Packard 6890 Series GC System) equipped with a polar fused-silica capillary column (Supelco, USA) of 100 m by 0.25 mm and with a 0.2 μm film thickness. Fatty acids were identified by comparing the retention times of methyl esters from the samples to standards from a Supelco ME19-Kit (*Fatty Acid Methyl Esters C4-C24*). Fatty acid concentrations are presented as mg/100 g.

- *Total amino acids*: Samples were previously hydrolyzed in 6 N double distilled hydrochloric acid ($110^{\circ}\text{C}/24\text{ h}$), followed by precolumn derivatization with phenyl

isothiocyanate (PITC) according to White et al. (1986). Identification was performed using a high-resolution liquid chromatograph (Varian, Waters 2690, California, USA) equipped with a reversed-phase C18 column (PICO-TAG, 3.9 x 150 mm) with detection at 254 nm. Chromatographic separation was performed at a 1 mL/min constant flow rate and 35°C, with a 21 min run length. Quantification was performed using external standards (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany).

Chemical scores provide a comparison between the essential amino acid content from a test protein to the corresponding amino acid from a standard protein. The reference standard most utilized is that by the Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO) (2007).

- *Hydrophobicity profile*: This analysis was performed according to Bezerra et al. (2016) with modifications. A total of 1 g of each sample was diluted in 10 mL of ultrapure water (MilliQ), mixed in a mini Turrax mixer for 3 min, centrifuged and filtered through a 0.45 µm cellulose membrane. Analyses were performed using a high-resolution liquid chromatograph (Varian, Waters 2690, California, USA) equipped with a reversed-phase C18 column (Nova-Pak 4.6 x 250 mm cartridge) and 4 µm beads (Waters, Ireland). The injection volume was 20 µL. The mobile phase buffer A was composed of 98.925% water, 0.075% trifluoroacetic acid (TFA) and 1.000% acetonitrile (v/v). After equilibrium was achieved inside the column with 100% buffer A for 30 min, the peptide samples were eluted by a linear gradient from 0 to 100% of buffer B. The isocratic flow rate was 0.5 mL/min with detection at 218 nm.

- *Polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate (SDS) and β-mercaptoethanol*: This procedure was performed to determine the protein fractions of the viscera, as described by Laemmli (1970). The stacking gel was prepared at 4% polyacrylamide in 0.5 M Tris-HCl buffer at a pH of 6.8 with 1% SDS. The main gel

was prepared at 15% polyacrylamide in 3 M Tris-HCl buffer at a pH of 8.8 with 1% SDS. Samples were dissolved (10 mg protein/mL) in a reducing buffer at a pH of 6.8 (0.5 M Tris-HCl, 10% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol and 0.1% bromophenol blue) and kept at 90°C for 15 min. The run was performed at constant current (25 mA). At the end of the run, the gel was removed from the plate, fixed in 12.5% TCA for one hour and stained with 0.005% Coomassie brilliant blue R-250. Aliquots of 10 μ L of each sample were transferred to the wells. The removal of excess dye was performed with a bleaching solution of methanol, acetic acid and water (1:3.5:8. v/v/v).

2.3 Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) with a completely randomized design (CRD), and the means were compared using the Tukey test at the 5% significance level with the SAS Institute software (2014).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Chemical composition and fatty acid profile.

The results in Table 1 show that individual and mixed goat viscera display high protein (16.76 to 22.63 g/100 g) and moisture (63.47 to 77.06 g/100 g) contents but lower fat concentrations (2.26 to 6.36 g/100 g). Among the by-products, lungs had the highest protein content (~75% dry weight, d.w.). The high protein content of the mixture (~65% d.w.) showed that the viscera are significant nutrient sources, indicating their potential use for the nutritional enrichment of other foods (Honikel, 2011; Nollet & Toldrá, 2011).

The fat content showed greater variation from 2.26 to 6.63 g/100 g, with the heart and liver displaying the highest lipid contents. According to Honikel (2011), the fat content in these by-products is generally low (<5%) and comparable to that of the meat. It is well known that goats can store high amounts of fat in the visceral cavity, which explains the fat percentages obtained. Individually, the viscera showed variable percentage values ($P < 0.05$), and as expected, the mixture had intermediate values. The composition of goat viscera was in accordance with the values for goats and sheep reported by Honikel (2011), Madruga et al. (2003) and Anderson (1988). It is noteworthy that the total protein and lipid contents in the raw material are generally relevant in the decision making relating to the use and recovery of these by-products (MAMELONA et al., 2010).

Regarding the chemical quality, the saturated fats, which are rich in saturated fatty acids, found in goat viscera represent 0.88 to 3.29 g fatty acids/100 g of sample, followed by monounsaturated fatty acids (0.60 to 1.78 g fatty acid/100 g of sample) and polyunsaturated fatty acids (0.13 to 0.55 g fatty acids/100 g of sample). In a detailed analysis (Table 1), 22 fatty acids were identified in the lipid profiles of both the individual by-products and the mixture, of which seven were saturated (54.66 – 58.92%), eight were monounsaturated (32.07 – 37.77%), and seven were polyunsaturated (8.07 – 9.01%).

The heart had the highest values of fatty acids, which is explained by it having the highest fat content. According to Prates et al. (2011), the fatty acid composition of edible by-products depends on the fatty acid content of the tissue in addition to genetic as well as nutritional characteristics of the animal.

Among the identified fatty acids, stearic (C18:0) and palmitic (C16:0) acids are highlighted, with values varying from 0.32 to 1.78 acid/100 g of sample and 0.43 to

1.32 g fatty acid/100 g of sample, respectively. According to Branskalieva et al. (2000), these fatty acids are among the main acids found in goat meat. The highest concentrations of unsaturated fatty acids were found for C18:1n9t (0.40 to 1.34 g fatty acid/100 g of sample) and C18:2n6t (0.07 to 0.33 g fatty acid/100 g of sample).

Madruga et al. (2013) emphasize that fatty acids derived from goat products are precursors of volatile compounds and that the use of goat viscera to obtain protein hydrolysates increases their potential applicability in food technology as flavorings and functional ingredients. According to Martinez-Alvarez et al. (2015), such properties increase the interest in utilizing these protein hydrolysates in the production of animal or human food.

3.2 Total amino acid profile

Table 2 shows the values of amino acids identified in individual goat viscera and their mixture. All essential amino acids were detected in non-limiting amounts given that their mean chemical score varied from 3.2 to 22.3. According to Pires et al. (2006), essential amino acids with a chemical score greater than 1.0 can be characterized as excellent protein sources and as having a high biological value capable of nourishing the organism, as they represent values exceeding the daily recommended amounts for adults according to FAO (2007).

At the same time, the amino acid profile found in this study for goat viscera is in accordance with the statements of Aristoy & Toldrá (2011) that edible meat by-products are an excellent nutrient source, exhibit a balanced amino acid profile similar to that found in the meat and include all essential amino acids.

A few authors have studied the amino acid profile in goat viscera-based products, e.g., goat *sarapatel* (Brasil et al., 2014) and goat *buchada* (Queiroz et al.,

2013), and they revealed results similar to those found in the present study. This similarity confirms that these by-products are an excellent alternative for nutritional enrichment and a potential source for novel products.

3.3 Hydrophobicity and electrophoretic profiles

The peptides found in individual viscera and their mixture were eluted for a total of 60 min. The hydrophilic peptides were eluted within the first 30 min, followed by the hydrophobic peptides (Figure 1A). Considering that the chromatograms for the individual organs and the mixture displayed similar profiles with peaks throughout the run, it can be noted these goat viscera samples exhibited both hydrophilic and hydrophobic peptides. According to Adler-Nissen (1986), hydrophobic peptides pose a disadvantage in producing protein hydrolysates due to their bitter taste. However, the enzyme Alcalase® is listed as an excellent option to minimize bitterness. Alcalase® is a type of serine protease, which can cleave peptide bonds, particularly those with a hydrophobic side chain at the C-terminal position (Adler-Nissen, 1986).

Figure 1B shows that the sum of peak areas from the chromatograms of goat viscera varied from 0.59 to 1.01. The heart and lungs presented the lowest and highest values, respectively, within the method settings. The mixture and the liver had intermediate values of 0.69 and 0.89, and they were significantly different from one another at a 5% significance level. In the study of Costa et al. (2014), peptides resulting from hydrolysates can display antioxidant and antimicrobial activities. These results reinforce the potential of goat viscera as raw materials for products with biological activity, such as protein hydrolysates.

Figure 1 shows the electrophoretic profile, for which proteins are separated based on size relative to standards of known molecular mass (Simpson, 2011; Lovric,

2011; Nelson & Cox, 2011). Several high molecular mass bands can be observed in the goat viscera profile (12 to 225 kDa). These results suggest that these proteins have high potential to be cleaved during enzymatic hydrolysis, corroborating their use in the production of protein hydrolysates. Mora et al. (2014) mentioned that meat by-products are protein-rich and therefore constitute an excellent substrate for proteolysis. In this context, the potential of goat viscera and their mixture for producing potentially bioactive and functional peptides through enzymatic hydrolysis has been determined.

4. CONCLUSION

Goat viscera are raw materials with the potential to be used in the production of novel food products or ingredients due to their nutritional quality and, most importantly, their protein profile, particularly the amino acid, hydrophobicity and electrophoretic profiles. These observations confirm that these proteins can be cleaved by enzymatic hydrolysis to produce protein hydrolysates with broad technological applications in addition to adding value to goat slaughtering by-products.

Conflict of interest

Nothing to declare.

Acknowledgements

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq) and the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES) for the financial support and scholarship granted to the first author.

REFERENCES

- Adler-Nissen, J. (1986). A review of food hydrolysis specific areas. *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*, 57-109.
- Amaral, D. S., Silva, F. A. P., Bezerra, T. K. A., Arcanjo, N. M. O., Guerra, I. C. D., Dalmás, P. S., & Madruga, M. S. (2015). Effect of storage time and packaging on the quality of lamb pâté prepared with variety meat. *Food Packaging and Shelf Life*, 3, 39-46.
- Anderson, B. A. (1988). *Composition and nutritional value of edible meat by-product*. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. (Eds.), *Advances in Meat Research*. New York: Elsevier Applied Science, 5, 15-45.
- AOAC. (2010). *Association of Official Analytical Chemists*. Official Methods of Analysis.
- Aristoy, M. C., & Toldrá, F. (2011). *Essential Amino Acids*. In L. M. L. Nollet, F. Toldrá, (Eds.), *Handbook of analysis of edible animal by-products* (123-135 pp.). New York: CRC Press.
- Arvanitoyannis, I. S., Bloukas, J.G., Pappa, I., & Psomiadou, E. (2000). Multivariate data analysis of cavourmas – a Greek cooked meat product. *Meat Science*, 54, 71–75.
- Bezerra, T. K. A., Araújo, A. R. R., Nascimento, E. S., Paz, J. E. M., Gadelha, C. A. A., Gadelha, T. S., Pacheco, M. T. B., Queiroga, R. C. R. E., Oliveira, M. E. G., & Madruga, M. S. (2016). Proteolysis in goat “coalho” cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, 196, 359-366.

Branskalieva, V., Sahlu, T., & Goetsch, A. L. (2000). Fatty acid composition of goat muscles and fat depots: a review. *Small Ruminant Research*, 37, 255-268.

Brasil, L., Queiroz, A., Silva, J., Bezerra, T., Arcanjo, N., Magnani, M., Souza, E., & Madruga, M. (2014). Microbiological and Nutritional Quality of the Goat Meat By-Product “Sarapatel”, *Molecules*, 19, 1047-1059.

Costa, R. G., Madruga, M. S., Santos, N. M., & Medeiros, A. N. (2005). Qualidade físico-química, química e microbiológica da buchada caprina. *Higiene Alimentar*, 19.

Costa, W. K. A., Souza, E. L., Beltrão-Filho, E. M., Vasconcelos, G. K. V., Gadelha, T. S., Gadelha, C. A. A., Franco, O. L., Queiroga, R. C. R. E., & Magnani, M. (2014). Comparative Protein Composition Analysis of Goat Milk Produced by the Alpine and Saanen Breeds in Northeastern Brazil and Related Antibacterial Activities. **PLOS ONE**, 9, 1-9.

Dieterich, F., Boscolo, W. R., Bertoldo, M. T. P., Silva, V. S. N., Gonçalves, G. S., & Vidotti, R. M. (2014). Development and characterization of protein hydrolysates originates from animal agro industrial by products. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 1, 2.

Dalmás, P.S., Bezerra, T.K.A., Morganob, M.A., Milanib, R.F., & Madruga, M.S. (2011). Development of goat pâté prepared with variety meat. *Small Ruminant Research*, 98, 46- 50.

FAO. (2007). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Protein and amino acid requirements in human nutrition. Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation: WHO. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

- Folch, J., Less, M., & Stanley, S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- Guerra, I.C.D., Félex, S.S.S., Meireles, B.R.L.M., Dalmás, P.S., Moreira, R.T., Honório, V.G., Morgano, M.A., Milani, R.F., Benevides, S.D., Queiroga, R.C.R.E., & Madruga, M.S. (2011). Evaluation of goat mortadella prepared with different levels of fat and goat meat from discarded animals. *Small Ruminant Research*, 98, 59-63.
- He, S., Franco, C., & Zhang, W. (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP), *Food Research International*, 50, 289-297.
- Honikel, K. O. (2011). *Composition and calories*. In: L. M. L. Nollet, F. Toldrá (Eds.), *Handbook of analysis of edible animal by-products* Boca Raton, FL, USA: CRC Press. 105-121.
- Kirton, A. H., Mercer, G. J. K., Duganzich, D. M., & Uljee, A. E. (1995). Use of electronic probes for classifying lamb carcasses. *Meat Science*, 39, 167-176.
- Klomklao, S., Kishimura, H., & Benjakul, S. (2013). Use of viscera extract from hybrid catfish (*Clarias microcephalus* x *Clarias gariepinus*) for the production of protein hydrolysate from toothed ponyfish (*Gazza minuta*) muscle. *Food Chemistry*, 136, 1006-1012.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Lovric, J. (2011). **Proteomics**. Wiley Blackwell Publication, 283 p.

Madruga, M. S., Rezer, J. S., Pedrosa, N. A., & Melo, H. M. G. (2003). Caracterização química e microbiológica de vísceras caprinas destinadas ao preparo de buchada e picado. *Revista Nacional da Carne*, 316, 36-45.

Madruga, M. S., Santos, N. M., Costa, R.G., Medeiros, A. N., Queiroga, R. C. R. E., Schuller, A. R., Galvão, M. S., Cavalcanti, R. N., & Campos, R. J. A. (2007). Fat components from precooked “buchada”: na edible goat meat by-product. *Ciencia e Tecnología Alimentaria*, 5, 265-270.

Madruga, M., Dantas, I., Queiroz, A., Brasil, L., & Ishihara, Y. (2013). Volatiles and water- and fat-soluble precursors of saanen goat and cross suffolk lamb flavour. *Molecules*, 18, 2150-2165.

Mamelona, J., Santi-Louis, R., & Pelletier, E. (2010). Nutritional composition and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from echinoderm by-products. *Journal of Food Science and Technology*, 45, 147-154.

Martinez-Alvarez, O., Chamorro, S., & Brenes, A. (2015). Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. *Food research international*, 73, 204 – 212.

Mora, L., Reig, M., & Toldrá, F. (2014). Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food research international*, 65, 344-349.

Morales-Medina, R., Tamm, F., Guadix, A. M., Guadix, E. M., & Drusch, S. (2016). Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray drying. *Food Chemistry*, 194, 1208-1216.

Nelson, D., & Cox, M. (2011). *Princípios da bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed, 5ª ed., 1273 p.

Nollet, L. M. L., & Toldrá, F. (2011). *Introduction. Offal meat: Definitions, regions, cultures, generalities*. In: L. M. L. Nollet, F. Toldrá (Eds.), *Handbook of analysis of edible animal by-products*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 3–11.

O’Fallon, J. V., Busboom, J. R., Melson, M. L., & Gaskins, C. T. (2007). A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to went meat tissues, oils and feedstuffs. *Journal Animal Science*, 85, 1511-1521.

Pires, C.V., Oliveira, M.G.A., Rosa, J.C., & Costa, N.M.B. (2006). Nutritional quality and chemical score of amino acids from different protein sources. *Food Science and Technology*, 26, 179-187.

Prates, J.A.M., Alfaia, C.M., Alves, S.P., & Bessa, R.J.B. (2011). *Fatty Acids*. In: Nollet, L.M, Toldrá, F. (Eds.), *Handbook of analysis of edible animal by-products*. CRC Press, New York, 137-159.

Queiroz, A. L. M., Brasil, L. M. S., Silva, J., Magnani, M., Souza, E. L., & Madruga, M. S. (2013). Microbiological and nutritional quality of “buchada caprina”, an edible goat meat by-products. *Small Ruminant Research*, 115, 62-66.

Rosa, G. T., Pires, C. C., Silva, J. H. S., & Motta, O. S. (2002). Proporções e Coeficientes de Crescimento dos não-Componentes da Carcaça de Cordeiros e Cordeiras em Diferentes Métodos de Alimentação, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31, 2290-2298.

Santos, E. M. et al., 2003. Physicochemical and sensory characterization of *Morcilla de Burgos*, a traditional Spanish blood sausage. *Meat Science*, 65, 893-898.

Santos, N. M., Costa, N. M., Medeiros, A. N., Madruga, M. S., & Queiroga, R. C. R. E. (2007). *Buchada Caprina: características físico-químicas e microbiológicas*. Areia-PB: UFPB/CCA.

SAS Institute., 2014. *SAS user's guide: Statistics*, version 11.0. Cary, NC, USA: SAS Institute.

Silva, F.A.P., Amaral, D.S., Guerra, I.C.D., Dalmás, P.S., Arcanjo, N.M.O., Bezerra, T.K.A., Beltrão Filho, E.M., Moreira, R.T., & Madruga, M.S. (2013). The chemical and sensory qualities of smoked blood sausage made with the edible by-products of goat slaughter. *Meat Science*, 94, 34-38.

Simpson, R. J. (2011). *Proteins and proteomics*. New York. Cold Sprong Harbor Laboratory Press, 926 p.

Toldrá, F., Aristoy, M. C., Mora, L., & Reig, M. (2012). Innovations in value-addition of edible meat by-products. *Meat Science*, 92, 290-296.

White, J. A., Hart, R. J., & Fry, J. C. (1986). An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry*, 8, 170-177.

Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E. J., & Ahn, D. U. (2010). Improving functional value of meat products. *Meat Science*, 86, 15–31.

Table 1: Averages of chemical quality (g / 100g sample) and fatty acid profile (g fatty acid / 100g sample) of goat viscera and their mixture.

Parameters	Mixture of viscera	Heart	Liver	Lung
Moiture	71.22 ^{ab} ±0.86	70.94 ^b ±3.68	63.47 ^c ±3.29	77.06 ^a ±1.10
Ashes	0.92 ^{bc} ±1.37	0.74 ^c ±0.23	1.23 ^b ±0.13	0.68 ^c ±0.19
Protein	18.55 ^b ±0.35	16.76 ^b ±1.38	22.63 ^a ±3.85	17.19 ^b ±0.94
Fat	4.01 ^b ±0.91	6.36 ^a ±2.81	5.98 ^a ±1.18	2.26 ^b ±0.31
SFA	3.27 ^a ±0.01	3.29 ^a ±0.05	2.23 ^b ±0.03	0.88 ^c ±0.00
C12:0	0.04 ^{bc} ±0.00	0.04 ^a ±0.01	0.04 ^{bc} ±0.00	0.03 ^c ±0.00
C14:0	0.15 ^b ±0.01	0.23 ^a ±0.01	0.07 ^c ±0.06	0.03 ^c ±0.01
C15:0	0.04 ^b ±0.01	0.09 ^a ±0.01	0.02 ^c ±0.01	0.03 ^{bc} ±0.00
C16:0	1.32 ^a ±0.01	1.10 ^a ±0.71	0.97 ^{ab} ±0.21	0.43 ^b ±0.04
C17:0	0.02 ^{ab} ±0.01	0.04 ^a ±0.03	0.01 ^b ±0.01	0.03 ^{ab} ±0.00
C18:0	1.68 ^a ±0.08	1.78 ^a ±0.87	1.10 ^a ±0.42	0.32 ^b ±0.04
C22:0	0.02 ^a ±0.00	0.01 ^b ±0.00	0.02 ^a ±0.01	0.01 ^b ±0.00
MUFA	1.78 ^a ±0.00	1.77 ^a ±0.08	1.40 ^b ±0.03	0.60 ^c ±0.00
C14:1	0.05 ^{ab} ±0.00	0.08 ^a ±0.02	0.03 ^{bc} ±0.02	0.01 ^c ±0.00
C16:1	0.11 ^b ±0.01	0.15 ^a ±0.05	0.07 ^b ±0.03	0.02 ^c ±0.00
C17:1	0.03 ^b ±0.00	0.04 ^a ±0.01	0.02 ^b ±0.00	0.01 ^c ±0.00
C18:1n9t	1.34 ^a ±0.08	1.24 ^a ±0.69	0.95 ^{ab} ±0.39	0.40 ^b ±0.04
C18:1n9c	0.01 ^a ±0.00	0.11 ^a ±0.01	0.01 ^{ab} ±0.00	0.00 ^b ±0.00
C20:1	0.04 ^b ±0.03	0.05 ^{ab} ±0.02	0.07 ^a ±0.01	0.01 ^c ±0.00
C22:1n9	0.19 ^{ab} ±0.01	0.10 ^c ±0.05	0.24 ^a ±0.05	0.14 ^{bc} ±0.00
C24:1	0.01 ^b ±0.00	0.00 ^d ±0.00	0.01 ^a ±0.00	0.01 ^c ±0.00
PUFA	0.50 ^b ±0.00	0.53 ^b ±0.00	0.55 ^b ±0.00	0.13 ^a ±0.00

C18:2n6t	0.33 ^{ab} ±0.04	0.43 ^a ±0.05	0.32 ^b ±0.10	0.07 ^c ±0.00
C18:2n6c	0.02 ^a ±0.00	0.02 ^a ±0.00	0.01 ^b ±0.00	0.01 ^a ±0.00
C20:2	0.02 ^b ±0.01	0.02 ^b ±0.00	0.03 ^a ±0.01	0.01 ^b ±0.00
C18:3n3	0.01 ^{ab} ±0.00	0.00 ^b ±0.00	0.01 ^a ±0.00	0.00 ^c ±0.00
C20:4n6	0.01 ^{ab} ±0.01	0.01 ^a ±0.01	0.00 ^{ab} ±0.00	0.00 ^b ±0.00
C22:2	0.04 ^b ±0.00	0.03 ^{bc} ±0.00	0.06 ^a ±0.01	0.02 ^c ±0.00
C22:6n3	0.07 ^b ±0.01	0.02 ^c ±0.01	0.12 ^a ±0.04	0.02 ^c ±0.00

The different letters on the same line are significantly different (Tukey's test. $P < 0.05$).

Table 2: Total amino acid profile (mg / g protein) of goat viscera and their mixture.

Amino acids	Mixture of viscera	Heart	Liver	Lung	Chemical score (Min –Max)
Essential amino acids					
Histidine	0.97 ^b ±0.05	1.23 ^a ±0.02	1.19 ^a ±0.04	1.01 ^b ±0.03	6.5 – 3.2
Threonine	2.22 ^b ±0.07	2.50 ^a ±0.19	2.56 ^a ±0.05	2.04 ^b ±0.04	8.9 – 11.1
Valine	1.29 ^b ±0.11	1.51 ^a ±0.06	1.63 ^a ±0.04	1.32 ^b ±0.06	3.3 – 4.2
Methionine	3.74 ^b ±0.09	3.55 ^b ±0.15	4.18 ^a ±0.17	3.49 ^b ±0.11	15.9 – 19
Isoleucine	1.86 ^c ±0.11	2.26 ^b ±0.04	2.72 ^a ±0.06	2.01 ^c ±0.07	6.2 – 9.1
Leucine	4.87 ^{bc} ±0.03	4.98 ^b ±0.10	5.66 ^a ±0.13	4.75 ^c ±0.06	8.1 – 9.6
Phenylalanine+Tyrosine	6.85 ^{bc} ±0.09	7.57 ^b ±0.18	8.48 ^a ±0.05	7.14 ^c ±0.14	18.1– 22.3
Lisine	7.48 ^c ±0.22	9.27 ^a ±0.18	9.17 ^a ±0.15	8.23 ^b ±0.19	16.6 – 20.6
Non-Essential Amino Acids					
Aspartic acid	2.17 ^c ±0.05	2.66 ^a ±0.14	2.71 ^a ±0.05	2.38 ^b ±0.07	NA*
Glutamic acid	3.35 ^b ±0.14	3.94 ^a ±0.16	3.31 ^b ±0.08	3.33 ^b ±0.10	NA
Serine	1.49 ^{ab} ±0.10	1.65 ^a ±0.09	1.56 ^a ±0.07	1.34 ^b ±0.05	NA
Glycine	2.98 ^b ±0.10	2.91 ^b ±0.11	3.71 ^a ±0.02	3.59 ^a ±0.03	NA
Alanine	4.55 ^{ab} ±0.26	4.42 ^{ab} ±0.12	4.70 ^a ±0.22	4.18 ^b ±0.13	NA
Arginine	2.12 ^c ±0.11	2.25 ^{bc} ±0.07	2.80 ^a ±0.06	2.39 ^b ±0.06	NA
Total amino acids	45.94 ^b ±0.08	50.70 ^a 0.15	54.38 ^b ±0.05	47.20 ^a ±0.06	NA

The different letters on the same line are significantly different (Tukey's test. $P < 0.05$).

*NA- Not applicable. Reference FAO/WHO for adults (2007).

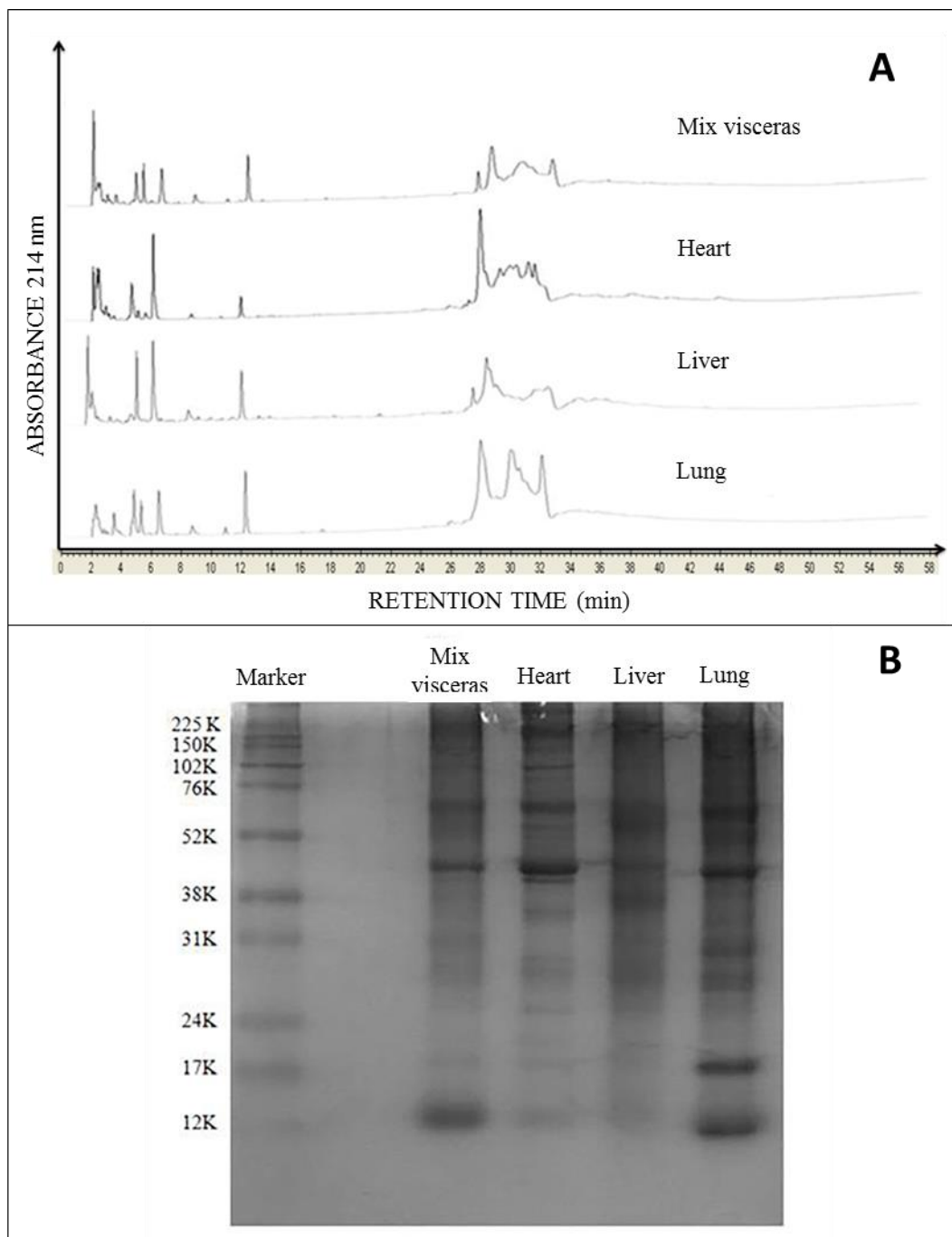


Figure 1: Profile of hydrophobicity (A) and electrophoretic profile of the protein fractions (B) of goat viscera and their mixture.

ARTIGO 2

**FUNCTIONAL PROTEIN HYDROLYSATE FROM GOAT BY-PRODUCTS:
OPTIMIZATION AND CHARACTERIZATION STUDIES**

**FUNCTIONAL PROTEIN HYDROLYSATE FROM GOAT BY-PRODUCTS:
OPTIMIZATION AND CHARACTERIZATION STUDIES**

Angela Lima Meneses de Queiroz¹, Taliana Kênia Alencar Bezerra¹, Sérgio de Freitas Pereira¹, Maria Elisa Caetano da Silva², Carlos Alberto de Almeida Gadelha¹, Tatiane Santi Gadelha¹, Maria Teresa Bertoldo Pacheco³, Marta Suely Madruga^{1*}

¹Post-Graduate Program in Food Science and Technology, Department of Food Engineering, Technology Centre, Federal University of Paraiba, 58051-900, Joao Pessoa, Paraiba, Brazil.

²Faculty of Food Engineering, University of Campinas, UNICAMP, 13083-862, Campinas, SP, Brazil.

³Institute of Food Technology (ITAL), Applied Chemistry and Nutrition Center, 13073-001, Campinas, São Paulo, Brazil.

*Autor correspondente: Tel: +55 83 32167576; Fax: +55 83 32167119

E-mail: msmadruga@uol.com.br

ABSTRACT

The protein hydrolysates of goat viscera were obtained using the Alcalase® and Brauzyn® enzymes then characterized by their chemical composition, total and free amino acids, hydrophobicity profile, as well as their functional properties and antioxidants activity. Hydrolysates with higher and lower degrees of hydrolysis of both enzymes were selected for the experimental design. Regarding the functional properties, maximum solubility values were achieved for the sample with a higher degree of hydrolysis; oil retention capacity showed higher values for the hydrolysates with lesser degree of hydrolysis. The emulsifying property and emulsion stability showed no significant difference in the four protein hydrolysates. In determining the antioxidant activity, higher reduction percentages

of free radical ABTS•+ were observed than for the free radical DPPH•. Based on the results, we conclude that the protein hydrolysates of goat viscera have great technological applicability to the food industry, in addition to being excellent sources of nutrients.

KEY WORDS: Alcalase®; Brauzyn®; essential amino acids; functional properties; goat by-products.

1. INTRODUCTION

By-products of animals have an economic impact on the meat industry due to their potential for technological transformation and energy utilization. Overall, the current volume of animal slaughter by-products generated by processing industries is about 24.5 million tons per year (Martinez-Alvarez, Chamorro & Brenes, 2015). According to Toldrá, Mora, & Reig (2016), the efficient use of cattle and pig slaughter by-products can generate overall economic gains of 11.4% and 7.5% to the productive sector, respectively.

Studies have been developed aiming at producing protein hydrolysates of high nutritional value from non-conventional sources of animal origin, such as the liver, lungs, heart, kidneys, brain and guts (Aristoy, & Toldrá, 2011). This is justified by the fact that these by-products are excellent sources of functional peptides, essential amino acids, vitamins and minerals. The production of biomolecules by enzymatic hydrolysis of proteins improves the performance of important biological activities according to the amino acid sequence, directing their use as nutraceutical ingredients, in addition to expanding the range of technological applications in the food industry as flavor enhancers and emulsifiers (Lafarga, & Hayes, 2014; Mora, Reig, & Toldrá, 2014).

Enzymatic hydrolysis is a fast and safe technique for the production of protein hydrolysates and food grade peptides. This technique has been used to improve the expression of functional and biological properties of proteins, adding innovation to low commercial value products (Mora, Reig, & Toldrá, 2014).

Enzymatic hydrolysis presents advantages compared to acidic and alkaline hydrolysis; among these is producing homogeneous protein hydrolysates compared to the size of the generated peptides by reducing compounds' secondary degradation formed during the process; making products with less bitter taste and low salt (He, Franco, & Zhang, 2013). The functional properties displayed by protein hydrolysates resulting from the enzymatic hydrolysis are dependent on various factors such as the nature of the substrate, specificity of the enzyme used, and the hydrolysis conditions (Kumar, Nazeer, & Ganesh, 2012). Thus, it is necessary that the process circumstances meet the conditions of highest activity, and therefore they need to be strictly defined.

Most of the studies reported in the literature directed to the use of animal slaughter by-products using processes with enzymatic hydrolysis mainly refer to fish waste, like catfish guts (Klomklao, Kishimura, & Benjakul, 2013), tilapia processing residue (Dieterich, Boscolo, Bertoldo, Silva, Gonçalves & Vidotti, 2014), or sardine (*S. pilchardus*) and mackerel (*T. mediterraneus*) processing residue (Morales-Medina, Tamm, Guadix, Guadix, & Drusch, 2016). A few other studies refer to obtaining protein hydrolysates from bovine slaughter by-products (Bah, Bekhit, McConnell & Meat, 2016), pig bones (Pagán, Ibarz, Falguera, & Benítez., 2013), sheep bones (Bhaskar, Modi, Govindaraju Radha, & Lalitha, 2007) or chicken bones (Lasekan, Bakar, & Hashim, 2013). However, no work has focused on the potential of using the residual viscera from slaughtered goat in obtaining new ingredients. Rose, Pires, Silva, & Motta (2002) proposed studies involving the use of goat viscera or other by-products as the

functional ingredients in processed meat products. Viscera represented by the heart, lungs, liver, kidneys, intestines, stomach, along with the brain and the blood represent on average 15% to 20% of the live weight of goats. Therefore, these percentages would have great economic impact if they were used as raw material in preparing new ingredients with technological application and/or nutrition. Given the above and considering the protein value of these viscera, this study aimed to enzymatically obtain protein hydrolysates of goat viscera using the Alcalase® and Brauzyn® enzymes, and evaluate their technological application by determining their functional properties, chemical composition, and their amino acid and hydrophilic profile.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Goat by-products (liver, lungs and heart) were used to obtain protein hydrolysate, acquired at the Central Market in the city of João Pessoa (Paraíba, Brazil). The goat viscera were soon collected after slaughter, put in a refrigerator ($2^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), and then transported to the laboratory where they were washed and weighed at a ratio of 1: 1: 1 (w / w). They were immediately crushed in a meat processor with 0.6 mm diameter disc (CAF machines, 5 model, São Paulo, Brazil), homogenized and put under commercial freezing ($-15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) for a period not exceeding 30 days, during which studies for obtaining protein hydrolysates were performed.

Two enzymes were used in the hydrolysis process: 2.4L Alcalase® (Novozymes Latino Americana Ltda, Paraná, Brazil), a serine protease of microbial origin (*Bacillus licheniformis*) with endogenous activity; and Brauzyn® (Prozyn Biosolutions, São Paulo, Brazil) a protease cysteine from a plant (*Carica papaya*) with exogenous activity.

2.2 Optimization of enzymatic hydrolysis process of goat viscera

The best hydrolytic conditions for the array (goat viscera) were selected by a central composite design (CCRD) 2^2 with 11 experiments, 4 factorial points (levels ± 1), 3 central points (level 0) and 4 axials (levels $\pm \alpha$), for each of the selected enzymes. The independent variables were the hydrolysis time (T) and the enzyme load (E:S); and the dependent variable was the degree of hydrolysis of the proteins. Hydrolysis was carried out for 180 min under agitation, in optimal pH and temperature conditions of each enzyme according to information provided by the manufacturer, being pH 7.0 and 60°C for Alcalase® and pH 6.5 and 70°C for Brauzyn®. The response surface model was prepared using the following equations:

$$DHA = \beta_0 + \beta_1 (E:S) + \beta_2 (T) - \beta_3 (E:S)^2 - \beta_4 (T)^2 + \beta_5 (T)(E:S) \quad (\text{Eq 1})$$

$$DHB = \beta_0 + \beta_1 (E:S) + \beta_2 (T) - \beta_3 (E:S)^2 + \beta_4 (T)^2 + \beta_5 (T)(E:S) \quad (\text{Eq 2})$$

Where:

DHA and DHB are the response values predicted by the model for Alcalase® and Brauzyn® enzymes respectively;

β_0 it is the average or constant coefficient;

β_1 and β_2 is the linear; β_3 and β_4 the quadratic and β_5 the interaction coefficients.

The comminuted mass goat by-products were thawed under refrigeration, weighed, homogenized in deionized water (1 : 2 w / v) and transferred to a double-walled glass reactor coupled to pH stat equipment (Automatic Titrator Model LD 50 Grafix, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) with stirring and heating system carried out by means of a thermostat bath connected to the reactor. During the hydrolysis reaction, the pH was kept constant by adding a NaOH solution (0.25 N), and

the base consumption was recorded by the equipment. The degree of hydrolysis (DH) is defined by Equation 3 (Adler-Nissen, 1986).

$$GH (\%) = B * Nb * \left(\frac{1}{\alpha}\right) * \left(\frac{1}{MP}\right) * \left(\frac{1}{htot}\right) * 100 \quad (\text{Eq.3})$$

Wherein: DH (%) = degree of hydrolysis; B = base consumption in ml; N_b = normality of base; 1 / α = average degree of dissociation of the α -NH₂; α = 0.5267; MP = mass of protein in g; h_{tot} = total number of peptide bonds in the protein substrate – 7.6 to meat (Adler-Nissen, 1986).

The highest and lowest degrees of hydrolysis were selected from among the 11 hydrolysates and then analyzed for its technological features (solubility, oil retention capacity, emulsifying capacity, emulsion stability and antioxidant activity) and its physico-chemical parameters (chemical composition, soluble protein profile of total and free amino acids and peptides of the hydrophobicity profile).

2.3 Protein hydrolysate characterization of goat viscera

2.3.1 Chemical composition and soluble protein: Moisture, ash and protein were determined using the methodology described in items N° 926.07B, 923.03 and 930.25, respectively, of the AOAC (2010). Ether extract was determined by following the procedures described by Folch, Less, & Stanley (1957). Soluble protein was according to the methodology described by Lowry, Rosebrough, Farr, & Randal (1951).

2.3.2 Total amino acids: TAA were quantified according to the method described by White Hart, & Fry, (1986), in which the total amino acids were determined in samples previously hydrolyzed in 6N hydrochloric acid, followed by the amino acids released by phenyl isothiocyanate (PITC). The separation of the derivatized amino acids was carried out by high-resolution liquid chromatography (Varian 2690 Waters, California, USA)

coupled with reverse phase C18 column (PICO-TAG, 3.9 x 150 mm). The sample injection (20 μ L) was performed manually and detection was at 254 nm. Chromatographic separation was performed at a constant flow of 1 ml/min at 35°C. The chromatographic run time was 21 minutes. Amino acids were identified by comparing retention times with ASA Standard-18 Sigma-Aldrich (Chemie GmbH, Steinheim, Germany) and the results were expressed as % area of the amino acid peaks.

2.3.3 Profile of free amino acids: The free amino acids of the evaluated cheeses were extracted by orbital shaking for 60 min with 0.1 M chloric acid (g/mL) followed by pre-column phenyl isothiocyanate (PITC) derivatization according to White, Hart, & Fry (1986) and Hagen, Frost, & Augustin (1989). Phenylthiocarbamyl amino acid (PTC-aa) derivative separation was performed in an HPLC system (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) and Luna C18 reversed-phase column (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m; Phenomenex Inc., Torrence, CA, USA). The mobile phases consisted of an acetate buffer at pH 6.4 and a 40 % acetonitrile solution. The sample was injected automatically (50 μ L), and detection was performed at 254 nm. Chromatographic separation was performed at a constant flow rate of 1 mL/min at a temperature of 35°C. The chromatographic run time was 45 min; the results are expressed as % area of the amino acid peaks.

2.3.4 Peptide hydrophobicity analysis: The separation of peptides by hydrophobicity was performed using a Nova-Pak C18 column (4.6 m x 250 mm, 4 μ m particle size, cartridge; Waters, Ireland) connected to a high-performance liquid chromatography system (Varian, Waters 2690, California, EUA). The injection volume of the soluble extract (0.2 g/mL) was 20 μ L, and the mobile phase was composed of eluent A (ultrapure water with 1% trifluoroacetic acid) and eluent B (acetonitrile with 1%

trifluoroacetic acid). A linear gradient of eluent A and eluent B was applied for 60 min with a flow rate of 1 mL/min, and detection was performed at 218 nm.

2.4 Functional properties of goat viscera protein hydrolysates

2.4.1 Protein Solubility: The protein solubility was determined by the method of Morr et al. (1985) with some modifications. Quantification of soluble protein in the supernatant was determined by the method of Lowry et al. (1951). The percentage of soluble protein was calculated according to Equation 4.

$$P.S (\%) = \left\{ \frac{A*50}{W*\frac{S}{100}} \right\} * 100 \quad (\text{Eq.4})$$

where: P.S = soluble protein content present in the sample [%]; A = protein concentration of the supernatant [mg/mL]; W = weight of the sample [mg]; S = protein concentration in the sample [%].

2.4.2 Oil retention capacity (ORC): This was determined according to the method of Fonkwe and Singh (1996). The results were expressed as amount of oil retained by the amount of total protein present in the sample.

2.4.3 Emulsifying capacity (EC) and emulsion stability: The EC was obtained according to the methodology described by Dench, Rivas & Caygill (1981) with modifications. The emulsifying capacity was calculated by the ratio of emulsified layer and the total height of the sample in ml oil/g protein. To determine the stability, the emulsion was heated in a water bath at 80°C for 30 minutes, cooled with running water for 15 minutes, followed by centrifugation at 253g for 15 minutes. The emulsion stability was expressed in percentage of the ratio between the height of the layer remaining emulsified and total sample height.

2.4.4 Antioxidant activity: Studies of antioxidant capacity were realized using two methods (radical activity DPPH• and overall activity by ABTS•+ method).

2.4.4.1 Determination of antioxidant activity total for the capture of free radical DPPH•: The activity of DPPH• radical was measured using the method proposed by Brand-Williams, Cuvelier, & Berset (1995). The absorbance reading was performed at 517 nm in a UV-visible spectrophotometer (Quimis®, Q798U Model, Shanghai, China). The sequester free radical capacity was expressed as a percentage of the radical oxidation inhibition.

2.4.4.2 Determination of total antioxidant activity by ABTS•+ method: The total antioxidant activity by ABTS•+ method was determined using the method proposed by Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Min Yang, & Rice-Evans (1999). The absorbance reading was performed at 734 nm in a UV-visible spectrophotometer (Quimis® Model Q798U). The ability to scavenge free radicals was calculated from the inhibition percentage based on the decrease in absorbance relative to background at time zero.

2.5 Statistical analysis

The Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the characterization and functional properties of goat viscera protein hydrolysates, in order to determine the enzyme effects and the degree of hydrolysis using the Statistical Analysis System software (version 11.0) (SAS, 2014).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Obtaining goat by-products protein hydrolysate

Experimental CCRD results are shown in Table 1 and the Pareto diagram (Figure 1A and 1B), exposing the significance of the variables and their interactions.

The degree of hydrolysis (DH) is a primary response in determining the optimization parameters and obtaining protein hydrolysates with different functionalities (Aldler-Nielsen, 1986). In this study, the hydrolysates that showed the highest and lowest value of obtained DH in different processing conditions were selected. The resulting R^2 in the model was 0.95262 for Alcalase® and 0.95117 for Brauzyn®; and according to the F test, this was a significant regression, as the $F_{\text{calculated}} > F_{\text{tabulated}}$, and showed no lack of fit ($F_{\text{calculated}} < F_{\text{tabulated}}$). Significant variables, their interactions, and the models can be expressed in Equations 5 and 6:

$$DHA = 13.44 + 1.85(E:S) - 0.22(E:S)^2 + 2.62(T) - 0.95(T)^2 + 0.91(T)(E:S) \text{ (Eq 5)}$$

$$DHB = 8.95 + 1.41(E:S) - 0.96(E:S)^2 + 3.11(T) + 0.39(T)^2 + 1.10(T)(E:S) \text{ (Eq 6)}$$

Wherein: DHA and DHB are the response values of the predicted degree of hydrolysis using the model for Alcalase® and Brauzyn® enzymes, respectively. In this model E:S (enzyme load) and T (hydrolysis time) are independent variables and DH is the dependent variable.

DH resulting from the experiment using Alcalase® and Brauzyn® enzymes showed variation from 8.58 to 17.63%, and 4.61 to 14.42%, respectively. Based on response surfaces (Figure 1C and 1D), we can confirm that the highest degree of hydrolysis was prepared from the hydrolysate using the Alcalase® enzyme. The results show that Alcalase® (microbial source) was faster in hydrolyzing the goat protein substrate, having a different kinetic reaction than Brauzyn® (of vegetable origin). At the end of the 180-minute period, the enzymes retained a difference of approximately 4 DH units together.

Alcalase® is an isolated microbial enzyme selected from strains of *Bacillus licheniformes*, and has been identified with great effectiveness in protein cleavage for

the production of functional peptides (Toldrá, Mora, & Reig, 2016; Liu, Li, Chen, Yu Wang, & Wang, 2014; Centenaro, Prentice-Hernández & Sallas-Mellado, 2009). This enzyme is described by acting on the cleavage of peptide bonds containing hydrophobic residues at the carboxyl side of the protein (Aldler-Nielsen, 1986), although their specificity has not been fully characterized.

Protein hydrolysates have different applications according to their degree of hydrolysis, the size of the formed peptides and the amino acid sequence. Hydrolysates with a low degree of hydrolysis exhibit technologically potential functional characteristics such as antioxidant activity, improved solubility, and foaming, among others. Those with a large degree of hydrolysis are mostly used as nutritional supplements in special medical diets or flavors (Vioque, Clement, Pedroche, Yust, & Millan, 2001). In this study, we chose to select the hydrolysates which showed the highest and lowest degree of hydrolysis and subsequent physical-chemical and technological features.

3.2 Characterization of goat by-products protein hydrolysates

The protein hydrolysates goats of greater and lesser degree of hydrolysis showed significant differences ($P < 0.001$) in the chemical composition parameters and soluble protein due to the hydrolysis process conditions. The high total protein (range 67.04 to 80.59 g/100g) and soluble content (between 25.84 to 32.72 mg/ml) present in the protein hydrolysates result in protein solubilization during the hydrolysis process. All hydrophilic material and low molecular size was solubilized and is separate from undigested insoluble fraction (Klomklao, Kishimura, & Benjakul, 2013), and was precipitated in the centrifugation and filtration steps. Studies by Klomklao, Kishimura, & Benjakul (2013), Witono, Taruna, Windrati, Azkiyah, & Norma (2016), Morales-

Medina, Tamm, Guadix, Guadix, & Drusch (2016) reported approximate values found in this study, ranging from 64.65 to 89.02 g/100g for protein content.

Lipid levels were satisfactory, with an average of 16.27 to 24.53 g/100 g; this is considered high, but justified since the raw material used in the experiment was goat viscera which has the particularity to store larger amount fats in the visceral cavity. According to Madruga, Dantas Queiroz, Brazil, & Ishihara (2013), fat derived goat products are precursors of volatile compounds; therefore, they have potential technological application as flavorings and functional food ingredients. Martinez-Alvarez, Chamorro & Brenes (2015) emphasize that these properties make the protein hydrolysates of interest to manufacture products for human or animal consumption.

The ash content of the protein hydrolysates proved to be higher than that reported for the original feedstock (mixture of goat viscera), which was on average 3.20 g/100 g (dry basis), this increase is probably the result of the added hydroxide sodium in an enzymatic process for maintaining static pH (Dieterich, Boscolo, Bertoldo, Silva, Goncalves, & Vidotti, 2014; Medina-Morales, Tamm, Guadix Guadix & Drusch, 2016). This hypothesis could be confirmed by comparing the results of the two enzymes since hydrolysates prepared with the Alcalase® enzyme (more alkaline nature) showed a higher concentration of mineral residue in relation to hydrolysates prepared with Brauzyn® (Zavareze, Silva, Sallas- Mellado, & Prentice-Hernández, 2009). High ash content was also reported by Zavareze, Silva, Sallas-Mellado, & Prentice-Hernández (2009), Dieterich, Boscolo, Bertoldo, Silva, Gonçalves & Vidotti (2014) and Morales-Medina, Tamm, Guadix, Guadix, & Drusch (2016), which corroborate the values obtained in this study.

The composition of total amino acids and free amino acids are shown in Tables 2 and 3, respectively. Goat protein hydrolysates are excellent sources of amino acids,

with well-balanced essential amino acids in adequate proportions. These data confirm the studies by Dieterich, Boscolo, Bertoldo, Silva, Gonçalves & Vidotti (2014) and Klomklao, Kishimura, & Benjakul (2013) in evaluating the profile of amino acids in protein hydrolysates derived from animal agribusiness and fish viscera extract by-products, respectively.

In the total amino acids profile, the values of glycine, glutamic acid, lysine and aspartic acid were the highest (11.97 to 14.32%, 9.43 to 13.82%, and 10.70 to 11.86% 8.42 to 11.22%, respectively) which together account for over 40% of the total content of amino acids present in these hydrolysates. Data presented by Morales-Medina, Tamm, Guadix, Guadix, & Drusch (2016) also showed higher values for aspartic acid and glutamic acid when they studied the functional and antioxidant properties of sardines (*S. pilchardus*) and mackerel (*T. mediterraneus*) protein hydrolysates. Witono, Taruna, Windrati, Azkiyah, & Norma (2016) mention that the high glutamic acid content makes the samples a great alternative for use as flavoring/flavor enhancer.

The presence of hydrophobic amino acids such as leucine, methionine, proline and alanine also express an important performance in the functional properties of food proteins (Witono, Taruna, Windrati, Azkiyah, & Standard, 2016). These authors state that the hydrophobic amino acids present in protein hydrolysates can exhibit excellent antioxidant properties and may be incorporated into other food products as a supplement.

According to Table 3, we can see that the degree of hydrolysis and enzyme used resulted in the release of different free amino acids (according to the conditions used in this experiment), showing that both are very influential variables in this parameter.

The specificity of the enzymes used in this experiment causes different breaking of peptide bonds along the protein chain, according to their amino acid sequence and

aerodynamic forming exposure with different functional groups. In this way, the release of different amino acids occurs, as well as low molecular weight of peptides that are qualitatively observed in the hydrophilicity profile (Figure 2).

The hydrophobicity profile (A) and the sum of peak areas of hydrophilic and hydrophobic peptides (B) of goat protein hydrolysates and mixture of goat viscera are shown in Figure 2. From this profile, the majority presence of hydrophilic nature of peptides can be identified, having technological application of improved solubility, water holding capacity and those of hydrophobic character; also generally exhibiting greater antioxidant activity as a result of their greater solubility in lipids (Qian, Jung, & Kim, 2008).

The formed peptides were eluted for a total time of 60 minutes; however, the chromatographic profile shows that the peptides have a hydrophilic character, being eluted in the initial 30 minutes of the run, followed by hydrophobic character. This behavior leads to the conclusion that the protein hydrolysates under study presented a predominantly hydrophilic nature of peptides.

Compared with the mixture of viscera used as the substrate, there was a significant increase in the hydrophilicity peak areas in the evaluated samples. This difference results from the enzymatic hydrolysis process, which is the cleavage of peptide bonds between specific amino acids at the enzyme binding site and thereby processed into peptides of different sizes and free amino acids (Zavareze, Silva, Sallas-Mellado, & Prentice-Hernandez, 2009).

3.3 *Functional properties of protein hydrolysates*

Among the features of desirable technological ingredients, solubility, emulsifying capacity, and oil retention capacity (He, Franco, & Zhang, 2013) are of greatest

importance in food formulation. Solubility is one of the main functional properties in the study of proteins in food (Witono, Taruna, Windrati, Azkiyah, & Norma, 2016), requiring that its value is high to achieve great features.

The solubility of protein hydrolysates with Alcalase® and Brauzyn® enzymes (pH 7), are shown in Figure 3A. There was a significant difference ($P < 0.0001$) in the interaction between the enzyme and the degree of hydrolysis. The solubility of the samples was higher when using the Alcalase® enzyme (53.62 and 58.97% for $< DH$ and $> DH$, respectively) compared with the values found for the hydrolysates prepared with the Brauzyn® enzyme (32.65 to 38.63% for the hydrolysates $< DH$ and $> DH$, respectively). The increased hydrophilicity of the resulting hydrolysate is from ionizable amino and carboxyl groups of the amino acids that were exposed during the hydrolysis of the protein, thus improving the product's solubility (Schmidt-Mellado & Salas, 2009).

The solubility values of goat hydrolysates were consistent with the values mentioned by Liu Li, Chen Yu, Wang, and Wang (2014) and Zavareze, Silva, Sallas-Mellado, & Prentice-Hernández (2009), which evaluated the solubility of protein hydrolysates obtained from fish by-products, with reported values of 80% and 40%, respectively.

Oil retention capacity (ORC) showed no difference ($P < 0.001$) for the different goat hydrolysates. According to Zavareze, Silva, Sallas-Mellado, & Prentice-Hernández (2009) this property is an important functional feature of great interest in industry, mainly for industrial processors of meat products. The ORC values obtained in this study ranged from 5.94 to 6.92 ml oil/g protein and corroborated with the data mentioned by He, Franco, & Zhang (2013), who obtained values of 4.3 to 7.8 mL oil/g protein to assess protein hydrolysates prepared from fish byproducts. Halim, Yusof, &

Sarbon (2016) report that the absorption of fat results in oil entrapment, and this ability of the peptides have influence on the product taste, causing wide and varied applicability in the food industry.

The emulsifying properties (defined as the ability of the material to form emulsion) and emulsion stability (defined as the ability to maintain the formed emulsion) (Witono, Taruna, Windrati, Azkiyah, & Norma, 2016) showed no significant difference in goat protein hydrolysates. The evaluated samples had values ranging from 63.25 to 64.83 ml oil/g protein for emulsifying capacity (EC) and 95.31% to 97.19% for emulsion stability (ES). These results were higher than those reported by Zavareze, Silva, Sallas-Mellado, & Prentice-Hernández (2009), who found values of 48.2 ml oil/g protein for the EC and 17.9% for ES of fish protein hydrolysates when using the Alcalase® enzyme.

Determination of the total antioxidant activity by free radical capture DPPH• and the ABTS•+ method is shown in Figure 3B. This was evaluated in four samples of goat viscera protein hydrolysates and only one sample (> GH Alcalase ®) showed reduced value ($P < 0.0001$) activity for the capture of DPPH• in relation to other samples.

The results shown in Figure 3B show that the values of the percentage free radical ABTS•+ reduction were more significant than for the free radical DPPH• for the four goat protein hydrolysates. The values were in the range from 62.05 to 70.65% for inhibiting the ABTS•+ and 5.76 to 42.24% for inhibition by DPPH•.

In general, these methods determine a substrate's ability to transfer electrons or hydrogen atoms which can react with free radicals to form more stable compounds (Medina-Morales, Tamm, Guadix Guadix & Drusch, 2016). Protein hydrolysates that exhibit this functional property are very desirable because they can be applied to food products in order to extend their shelf life (He, Franco, & Zhang, 2013). The antioxidant

activity evaluated by both systems (ABTS•+ and DPPH•) gives ability to stabilize the lipid component in the food, as well as extend its conservation (Herpandi, Rosma, & Nadiah, 2011).

The free amino acids in goat hydrolysates present acidic and basic characters, such as aspartic acid and histidine, respectively, by having carboxylic groups and amino groups in side chains, and therefore are chelators of metal ions and hydrogen donors (Qian Jung, & Kim, 2008). In addition, the amino acids tyrosine, methionine, tryptophan, cysteine and lysine are examples of amino acids that have antioxidant characteristics (Wang & Mejia, 2005). Moreover, others having the aromatic group in its chain such as phenylalanine and tyrosine, can contribute to donate electrons, and thus improve the capturing property of the radical (Rajapakse, Mendis, Jung, Je, & Kim, 2005). Thus, the presence of these amino acids is likely to influence the antioxidant capacity of the goat by-products protein hydrolysates.

It is worth mentioning that to improve upon on the physicochemical results (fat content, glutamic acid, free amino acids) and technological functionality (high CRO), we suggest other studies focusing on the flavoring potential of goat viscera protein hydrolysates.

4 CONCLUSION

Goat by-products protein hydrolysates showed excellent nutritional quality, with high protein content and a balanced amino acid profile of essential amino acids. They showed significant technological functional properties such as solubility, oil retention capacity, emulsifying property and emulsion stability, in addition to antioxidant activity, showing their potential for application as a functional ingredient in various products of the food industry.

Conflit of interest

None declared.

Acknowledgments

The authors would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) for the financial support and the scholarship granted to the first author, respectively.

REFERÊNCIAS

Adler-Nissen, J. (1986). A review of food hydrolysis specific areas. *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*, 57-109.

AOAC. (2010). *Association of Official Analytical Chemists*. Official Methods of Analysis.

Aristoy, M. C., & Toldrá, F. (2011). *Essential Amino Acids*. In L. M. L. Nollet; F. Toldrá, (Eds.), *Handbook of analysis of edible animal by-products*. New York: CRC Press, 123-135.

Bah, C. S. F., Bekhit, A. El-Din A., McConnell, M. A., & Carne, A. (2016). Generation of bioactive peptide hydrolysates from cattle plasma using plant and fungal proteases, *Food Chemistry*, 213, 98-107.

Bhaskar, N., Modi, V. K., Govindaraju, K., Radha, C., Lalitha, R.G. (2007). Utilization of meat industry by products: Protein hydrolysate from sheep visceral mass, *Bioresource Technology*, 98, 388–394.

- Bezerra, T. K. A., Araújo, A. R. R., Nascimento, E. S., Paz, J. E. M., Gadelha, C. A. A., Gadelha, T. S., Pacheco, M. T. B., Queiroga, R. C. R. E., Oliveira, M. E. G., & Madruga, M. S. (2016). Proteolysis in goat “coalho” cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, 196, 359-366.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Science and Technology*, 28, 25–30.
- Centenaro, G. S., Prentice-Hernández, C., & Sallas-Mellado, M. (2009). Efeito da concentração de enzima e de substrato no grau de hidrólise e nas propriedades funcionais de hidrolisados proteicos de corvine (*Micropogonias furnieri*). *Química Nova*, 32, 1792-1798.
- Dench, J. E., Rivas, R. N., & Caygill, J.C. (1981). Selected functional properties of sesame (*Sesamun insicum* L.) flour and two protein isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32, 557-564.
- Dieterich, F., Boscolo, W. R., Bertoldo, M. T. P., Silva, V. S. N., Gonçalves, G. S., & Vidotti, R. M. (2014). Development and characterization of protein hydrolysates originates from animal agro industrial by products. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 1, 2.
- Folch, J., Less, M., & Stanley, S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- Fonkwe, L. G., & Singh, R. K. (1996). Protein Recovery from Mechanically Deboned Turkey Residue by Enzymic Hydrolysis. *Process Biochemistry*, 31, 605-616.

- Hagen, S. R., Frost, B., & Augustin, J. (1989). Pre-column phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 72, 912- 916.
- Halim, N. R. A., Yusof, H. M., & Sarbon, N. M. (2016). Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 24-33.
- He, S., Franco, C., & Zhang, W. (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP), *Food Research International*, 50, 289-297.
- Herpandi, N. H., Rosma, A., & Nadiah, W. A. W. (2011). The tuna fish industry: a new outlook on fish protein hydrolysates. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 195-207.
- Klomklao, S., Kishimura, H., & Benjakul, S. (2013). Use of viscera extract from hybrid catfish (*Clarias microcephalus* x *Clarias gariepinus*) for the production of protein hydrolysate from toothed ponyfish (*Gazza minuta*) muscle. *Food Chemistry*, 136, 1006-1012.
- Kumar, N. S. S., Nazeer, R. A., & Ganesh, R. J. (2012). Functional properties of protein hydrolysates from different body parts of horse mackerel (*magalapis cordyla*) and croaker (*otolithes ruber*), *Mediterranean Journal Nutrition Metabolism*, 5, 105- 110.
- Lafarga, T., & Hayes, M. (2014). Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients, *Meat Science*, 98, 227-239.

- Lasekan, A., Bakar, F. A., & Hashim, D. (2013). Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources, *Waste Management*, 33, 552-565.
- Liu, Y., Li, X., Chen, Z., Yu, J., Wang, F., & Wang, J. (2014). Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. *Food Chemistry*, 151, 459-465.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randal, R. J. C. (1951). Protein measurements with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Madruga, M., Dantas, I., Queiroz, A., Brasil, L., & Ishihara, Y. (2013). Volatiles and water- and fat-soluble precursors of Saanen goat and cross Suffolk lamb flavour. *Molecules*, 18, 2150-2165.
- Martínez-Alvarez, O., Chamorro, S., & Brenes, A. (2015). Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. *Food Research International*, 73, 204-212.
- Mora, L., Reig, M., & Toldrá, F. (2014). Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food research international*, 65, 344-349.
- Morales-Medina, R., Tamm, F., Guadix, A. M., Guadix, E. M., & Drusch, S. (2016). Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray drying. *Food Chemistry*, 194, 1208-1216.

Morr, C.V., German, B., Kinsella, J. E., Regenstein, J. M., Van Buren, J.P., Kilara, A., Lewis, B.A., & Mangino, M. E. (1985). A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*, 50.

Pagán, J., Ibarz, A., Falguera, V., & Benítez, R. (2013). Enzymatic hydrolysis kinetics and nitrogen recovery in the protein hydrolysate production from pig bones, *Journal of Food Engineering*, 119, 655-659.

Qian, Z. J., Jung, W. K., & Kim, S. K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresource Technology*, 99, 1690-1698.

Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W. K., Je, J.Y., & Kim, S. K. (2005). Purification of radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38, 175-182.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Min Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.

Rosa, G. T., Pires, C. C., Silva, J. H. S., & Motta, O. S. (2002). Proporções e Coeficientes de Crescimento dos não-Componentes da Carcaça de Cordeiros e Cordeiras em Diferentes Métodos de Alimentação, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31, 2290-2298.

SAS INSTITUTE. (2014). *User's Guide to Statistics*. Version 11.0. North Carolina State University, Car.

Schmidt, C. G., & Salas-Mellado, M. (2009). Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. *Química Nova*, 32, 1144-1150.

Toldrá, F., Mora, L. & Reig, M. (2016). New insights into meat by-product utilization. *Meat Science*, 120, 54-59.

Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos. *Grasas y Aceites*, 52, 132-136.

Wang, W.Y., & De Mejia, E.G. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews Food Science Food Safety*, 4, 65-78.

Witono, Y., Taruna, I., Windrati, W. S., Azkiyah, L., & Norma, T. (2016). *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9, 482-92.

White, J. A., Hart, R. J., & Fry, J. C. (1896). An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry*, 8, 170-177.

Zavareze, E., Silva, C. M., Sallas-Mellado, M., & Prentice-Hernández, C. (2009). Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. *Química Nova*, 32, 1739-1743.

Table 1: Central composite rotatable design (2^2) for the enzymatic hydrolysis of goat by-products, using the Alcalase® and Brauzyn® enzymes.

Hydrolysates	Time (min)	E:S (μ L)	DH %	
			Alcalase®	Brauzyn®
1	- 1 (60)	- 1 (112)	8,63	5,32
2	- 1 (60)	+ 1 (336)	13,03	8,63
3	+ 1 (180)	- 1 (112)	9,57	6,38
4	+ 1 (180)	+ 1 (336)	17,63	14,09
5	- α (35)	0 (168)	9,75	5,13
6	+ α (205)	0 (168)	16,32	8,50
7	0 (120)	- α (89)	8,58	4,61
8	0 (120)	+ α (406)	14,60	14,42
9	0 (120)	0 (168)	12,76	8,44
10	0 (120)	0 (168)	13,54	10,48
11	0 (120)	0 (168)	14,01	7,92

DH= degree of hydrolysis; E:S - Substrate enzyme relationship in μ L.

Table 2: Total amino acid profile (% area) of protein hydrolysates goat by-products (p <0.01) on dry basis.

Amino acid	> DH		< DH		p	p	p
	Alcalase®	Brauzyn®	Alcalase®	Brauzyn®	Enzymes	DH	Enzymes*DH
Aspartic acid	11,22±0,63	10,23±0,77	9,81±0,93	8,42±0,53	ns	ns	ns
Glutamic acid	9,43±0,66	13,43±0,78	11,16±0,83	13,82±0,01	<0,001	ns	ns
Histidine	0,34±0,07	0,97±0,08	0,28±0,10	0,82±0,15	<0,001	ns	ns
Arginine	0,82±0,07	3,5±0,12	0,89±0,08	3,49±0,18	<0,001	ns	ns
Lysine	11,86±0,40	10,7±0,37	11,45±0,31	10,92±0,02	ns	ns	ns
Hydrophilic							
Serine	5,69±0,71	4,02±0,06	5,02±0,24	3,11±0,13	<0,001	ns	ns
Glycine	11,97±0,50	14,32±0,46	12,92±0,42	14,15±0,00	<0,001	ns	ns
Threonine	4,62±0,63	3,25±0,15	4,02±0,13	2,73±0,25	<0,001	ns	ns
Tyrosine	2,66±0,26	2,32±0,17	2,53±0,19	2,4±0,08	ns	ns	ns
Hydrophobic							
Alanine	9,75±0,48	9,26±0,27	9,7±0,03	9,99±0,49	ns	ns	ns
Proline	6,39±0,46	5,64±0,23	6,4±0,07	6,01±0,07	ns	ns	ns
Valine	2,56±0,21	1,58±0,23	2,54±0,27	1,53±0,02	ns	ns	ns
Methionine	6,69±0,54	5,15±0,07	5,58±0,05	5,08±0,11	ns	ns	ns
Isoleucine	2,09±0,04	2,19±0,27	4,25±1,94	2,4±0,08	ns	ns	ns
Leucine	7,32±0,64	7,68±0,51	8,21±1,93	10,87±0,07	ns	ns	ns
Phenylalanine	3,07±0,15	4,08±1,74	2,84±0,14	3,06±0,14	ns	ns	ns

> DH – higher degree of hydrolysis; < DH – lesser degree of hydrolysis; ns – there was no significant difference

Table 3: Free amino acid profile (% area) of protein hydrolysates goat by-products (p <0.01) on a dry basis.

Amino acid	> DH		< DH		p	p	p
	Alcalase®	Brauzyn®	Alcalase®	Brauzyn®	Enzymes	DH	Enzymes*DH
Aspartic acid	7,55±0,14	5,26±0,43	5,31±0,01	7,40±0,00	ns	ns	<0,001
Glutamic acid	13,01±0,53	16,2±0,70	16,37±0,02	17,77±0,00	<0,001	ns	ns
Histidine	1,48±0,61	2,71±0,04	1,28±0,01	3,77±0,00	<0,001	<0,001	ns
Arginine	1,97±0,04	0,83±0,03	0,47±0,00	0,32±0,00	<0,001	<0,001	<0,001
Lysine	6,81±1,37	6,64±0,45	7,69±0,03	6,00±0,03	ns	ns	ns
Hydrophilic							
Serine	4,08±0,39	5,33±0,44	2,00±0,00	3,32±0,00	<0,001	<0,001	ns
Glycine	3,17±0,20	8,48±0,05	6,50±0,02	11,12±0,01	<0,001	<0,001	ns
Threonine	6,02±0,15	3,71±0,20	1,67±0,00	3,01±0,00	ns	<0,001	<0,001
Tyrosine	3,83±0,12	3,03±0,21	4,62±0,19	3,05±0,00	<0,001	ns	ns
Hydrophobic							
Alanine	8,75±0,73	10,57±0,14	13,44±0,03	10,36±0,01	ns	<0,001	<0,001
Proline	4,48±0,44	4,90±0,12	3,94±0,01	4,30±0,01	ns	ns	ns
Valine	7,52±0,18	5,94±0,68	7,63±0,00	6,70±0,02	ns	ns	ns
Methionine	3,71±0,01	2,84±0,09	4,05±0,01	2,91±0,01	<0,001	<0,001	ns
Isoleucine	7,12±0,03	5,26±0,46	4,81±,00	3,95±0,01	<0,001	<0,001	ns
Leucine	12,59±1,01	9,33±0,15	13,69±0,03	10,92±0,00	<0,001	ns	ns
Phenylalanine	7,90±0,30	8,97±2,94	6,55±0,01	5,09±0,02	ns	ns	ns

> DH – higher degree of hydrolysis; < DH – lesser degree of hydrolysis; ns – there was no significant difference

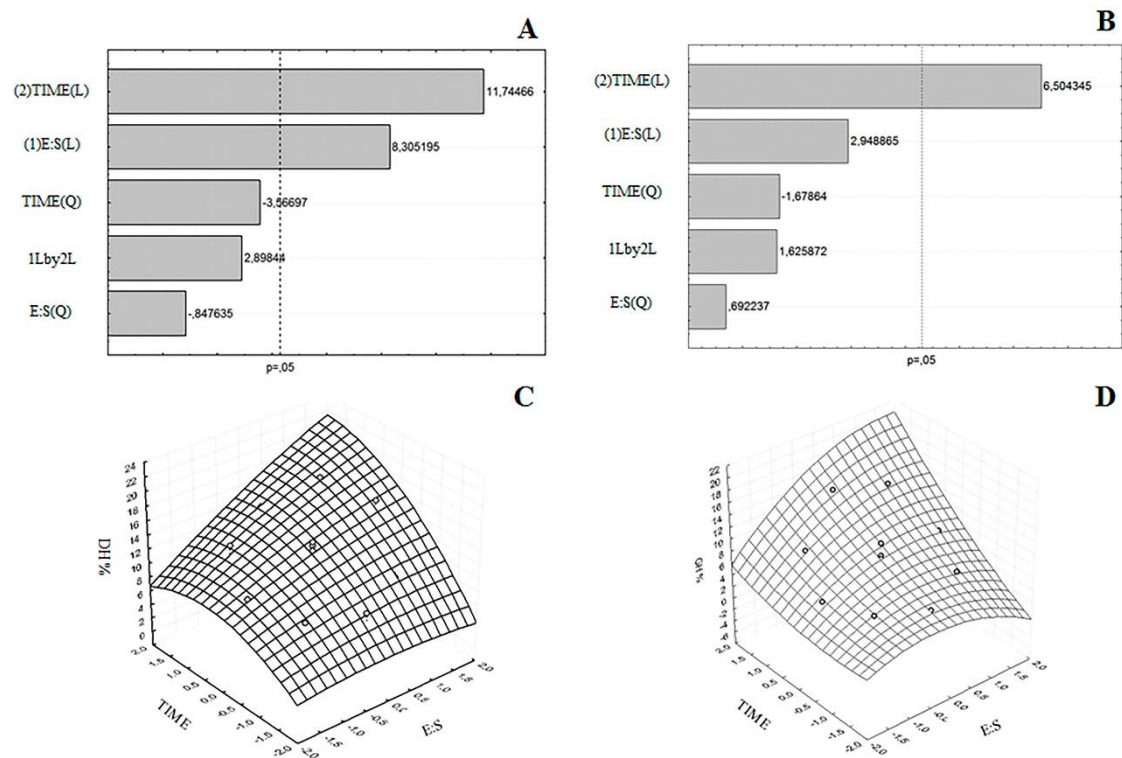
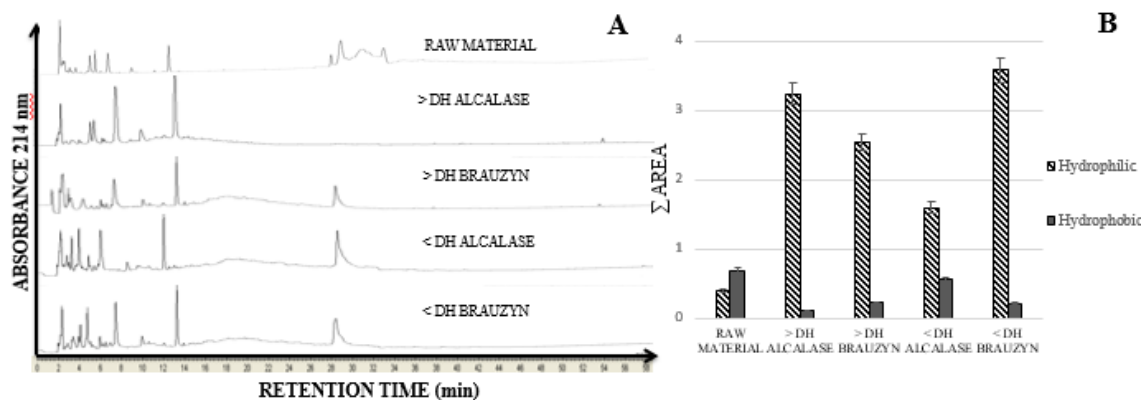


Figure 1: Pareto Chart and response surface dependent variable using Alcalase® (A and C) and Brauzyn® (B and D).



>DH – higher degree of hydrolysis; < DH – lesser degree of hydrolysis.

Figure 2: Hydrophobicity profile of peptides (A) and the sum of the areas of the peaks (B) the peptides of protein hydrolysates goat by-products.

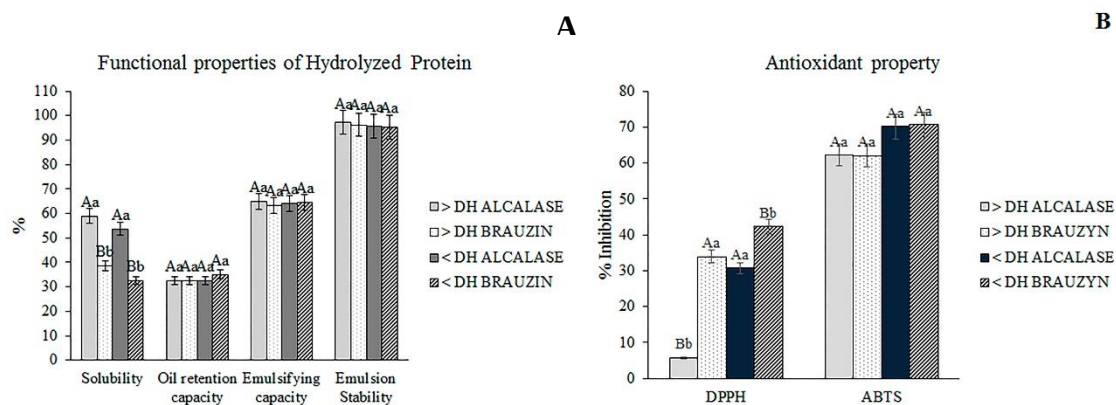


Figure 3: Functional properties (A) and antioxidant (B) protein hydrolysates of goat by-products. Triplicate experiments. Different lowercase letters indicate significant difference between the enzyme ($p < 0.01$) according to the Tukey test. Different capital letters indicate a significant difference between the degree of hydrolysis ($p < 0.01$) according to the Tukey test.

PATENTE DE INVENÇÃO

**“PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO FRACIONADO
PREPARADO A PARTIR DE VÍSCERAS CAPRINAS”**

PATENTE DE INVENÇÃO

“PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO FRACIONADO PREPARADO A PARTIR DE VÍSCERAS CAPRINAS”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se refere a um processo de preparação de um hidrolisado protéico líquido, pastoso e/ou em pó, preparado a partir de vísceras caprinas. O produto é obtido a partir dos subprodutos do abate de caprino e pode ser utilizado como ingrediente pelas indústrias de alimentos, por possuir várias propriedades funcionais tecnológicas, podendo ser incorporado a uma série de produtos alimentícios.

ANÁLISE DO ESTADO DA TÉCNICA

[002] A invenção PI 9909969-1 A intitulada “Processo para produzir proteína hidrolisada” de 26 de Dezembro de 2000, refere-se a um processo de obtenção de um hidrolisado protéico mediante hidrólise enzimática, porém utiliza proteína vegetal contendo sacarídeos e não proteína animal, como proposto neste documento.

[003] A invenção PI 0015587-0 A intitulada “Processo para produção de uma proteína hidrolisada” de 23 de Julho de 2002, trata-se da produção de uma proteína hidrolisada que pode ser utilizada como condimento ou semelhante, porém utiliza outras técnicas de produção e não a hidrólise enzimática, na qual não ocorrem perdas do ponto de vista nutricional, nem a formação de reações colaterais indesejáveis.

[004] A invenção PI 01169668-8 A intitulada “Processo para preparação de um hidrolisado de alto teor protéico” de 11 de Janeiro de 2005, refere-se a um processo de produção de hidrolisado também de alto valor protéico, porém é utilizada uma mistura de farinhas de sementes oleaginosas e sucessivas reações enzimáticas e não uma matéria-prima de origem animal.

[005] A invenção PI 0705220-0 A2 intitulada “Processo de obtenção de hidrolisado protéico em pó microencapsulado” de 23 de Junho de 2009, refere-se a um processo específico de obtenção de um hidrolisado protéico em pó e microencapsulado de origem animal, utilizando carne de frango, peixe, bovino e suíno, porém não usa vísceras caprinas para a sua obtenção.

[006] A invenção PCT/NZ/2012 131038PCT/3 intitulada “Edible composition and method of manufacture” do ano de 2002, trata-se de uma composição de um hidrolisado isolado, preparado a partir de uma fonte cárnea, para consumo humano. Porém, não utiliza os subprodutos do abate caprino como matéria-prima, como também não menciona a aplicabilidade tecnológica.

[007] A invenção CN 104222481-A intitulada “Using fish by-products for preparing fish protein hydrolysate used as food additive for preparing fried foods e.g. fried pasta, by adding enzyme to fish by-products, mixing, performing enzymolysis and processing enzymolyzed product” de 25 de Agosto de 2014, refere-se à preparação de um hidrolisado protéico de peixe usando os subprodutos do pescado com foco biológico, porém não apresenta aplicação tecnológica do hidrolisado obtido.

[008] No corrente estado da técnica, podemos observar alguns processos e produtos que apresentam características semelhantes, porém a escolha da proteína a ser utilizada, a enzima e o processamento é determinante na aplicação do hidrolisado obtido e estas podem ser tanto elaboração de produtos nutricionalmente modificados, quanto como funcionalidade tecnológica aplicada a outros produtos, obtenção de novos produtos alimentícios, entre outros.

[009] A invenção aqui descrita permite superar os limites do estado da técnica descritos anteriormente por utilizar uma matéria-prima de baixo custo, baixo ou nenhum aproveitamento por parte dos produtores, evitarem a contaminação ambiental quando estes são descartados de maneira incorreta, além de ser capaz de agregar valor aos subprodutos do abate caprino, já que o produto final, o hidrolisado protéico fracionado de vísceras caprinas, tem grande aplicabilidade tecnológica com potencial de ser utilizado em vários produtos da indústria alimentícia.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

[010] As vísceras representadas pelo coração, pulmões, fígado, rins, intestinos, estômagos, cérebro e sangue representam de 15% a 20% do peso vivo do animal em média, um rendimento extremamente significativo que pode ser revertido em lucro para o produtor se utilizadas como matéria prima na elaboração de produtos cárneos processados. Estes subprodutos apresentam excelente valor nutritivo, além de fonte de proteínas e integram a dieta em diferentes países. O descarte dos subprodutos e resíduos do abate não é uma tarefa prática, especialmente quando é gerada uma quantidade significativa, logo, é desejável processar todos os subprodutos em produtos de valor,

sejam para a alimentação humana, animal, produção de produtos farmacêuticos, fertilizantes ou ainda para a geração de biodiesel.

[011] A indústria está usando a ciência e inovação para agregar valor aos subprodutos de animais, muito além de sua rentabilidade de costume. Com o crescente interesse em ingredientes bioativos funcionais de alimentos fontes de proteína hidrolisada, identificar proteínas hidrolisadas que possuem propriedades tecnológicas em sistemas alimentares, ou ainda peptídeos com atividade biológica quando consumidos, pode ser uma alternativa interessante.

[012] O processo de hidrólise enzimática tem se destacado na melhoria das propriedades das proteínas, e tem como objetivo melhorar a sua funcionalidade em termos de propriedades funcionais, sensoriais, de textura e físico-químicas tais como: solubilidade, poder emulsificante, formação de espuma, gelificação, tendo grande aplicabilidade em vários produtos alimentícios. O produto resultante da hidrólise enzimática é altamente funcional, e quando utilizado como ingrediente na indústria de alimentos, confere propriedades de gelificação e textura, por exemplo, além de ter uma variedade de aplicações em outros tipos de indústrias, incluindo a farmacêutica, nutrição humana, sensorialidade e cosmética.

[013] A hidrólise enzimática apresenta vantagens quando comparadas com a hidrólise ácida e alcalina, tais como: menor amargura, preservação das funções tecnológicas ou biológicas e valor nutritivo, reduzido teor de sal dos hidrolisados finais, e ainda produzem hidrolisados mais homogêneos.

[014] Considerando o volume de subprodutos do abate caprino, a presente pesquisa tem como objetivo estudar o reaproveitamento destes, através da obtenção de um produto funcional, que possa ser agregado em produtos alimentícios para humanos e animais de pequeno porte ('pets') promovendo melhoria na sua qualidade, principalmente relacionadas às propriedades funcionais, tais como, gelificação, formação de espuma, poder emulsificante, aromatizante e palatabilizante.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[015] A presente invenção se refere a um processo de obtenção de um hidrolisado protéico em líquido, pastoso e em pó, a partir de vísceras caprinas, utilizando uma mistura de pulmão, coração e fígado (mix) na proporção de 1:1:1. Os produtos resultantes do presente estudo podem ser utilizados em formulações alimentícias, que podem conferir propriedades funcionais tecnológicas como melhorar solubilidade,

capacidade de formação de espuma, capacidade de retenção de água e óleo, capacidade emulsificante, entre outras. O processo da presente invenção corresponde às seguintes etapas:

- a) Lavagem, moagem e homogeneização das vísceras caprinas;
- b) Preparo do substrato (ajuste do pH e Temperatura de acordo com a enzima utilizada);
- c) Adição da enzima;
- d) Hidrólise enzimática do substrato preparado;
- e) Inativação térmica da enzima (temperatura/tempo);
- f) Centrifugação para separação das frações resultante da hidrólise enzimática, de acordo com a densidade;
- g) Liofilização (secagem) do sobrenadante ou adição de conservantes para as frações pastosas ou líquidas;
- h) Obtenção do hidrolisado protéico líquido, pastoso ou em pó, preparado a partir de vísceras caprinas.

BREVE DESCRIÇÃO DA FIGURA

[016] Figura 1: Fluxograma do processo de obtenção de hidrolisado protéico fracionado preparado a partir de vísceras caprinas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[017] A presente invenção tem como objetivo apresentar o processo de obtenção de hidrolisados protéicos fracionado, utilizando um mix de vísceras caprinas como matéria-prima. Este processo está mostrado na Figura 1 e compreende as seguintes etapas:

- a) Lavagem, moagem e homogeneização das vísceras caprinas;
- b) Preparo do substrato (ajuste do pH e Temperatura de acordo com a enzima utilizada);
- c) Adição da enzima;
- d) Hidrólise enzimática do substrato preparado;
- e) Inativação térmica da enzima (temperatura/tempo);
- f) Centrifugação para separação das frações resultante da hidrólise enzimática, de acordo com a densidade;

- g) Liofilização (secagem) do sobrenadante ou adição de conservantes para as frações pastosas ou líquidas;
- h) Obtenção do hidrolisado protéico líquido, pastoso ou em pó, preparado a partir de vísceras caprinas.

[018] Para o desenvolvimento do hidrolisado protéico são utilizadas as seguintes vísceras caprinas: fígado, pulmão e coração, na proporção de 1:1:1, obtidas em um fornecedor local em condições higiênicas. As vísceras caprinas são lavadas, trituradas em um moinho de carnes, com a finalidade de reduzir seu tamanho, aumentar a área superficial e com isso a eficácia da hidrólise, homogeneizadas e acondicionadas sob congelamento até a realização do processo (etapa a).

[019] Na etapa (b), o substrato obtido na fase (a) será preparado de acordo com as especificações das enzimas a serem utilizadas no processo de hidrólise enzimática. As enzimas utilizadas no processo de hidrólise são proteases comerciais. O mix de vísceras caprinas é homogeneizado em água deionizada (1:2 p/v) e colocado em um reator com aquecimento controlado através de banho termostatizado com sistema de agitação e controle de pH. As condições de pH e temperatura variam de 5,5 a 8,0 e a temperatura de 55 °C a 70 °C de acordo com as especificações de atividade ótima de cada enzima, que são fornecidas pelo fabricante na ficha técnica da enzima.

[020] Na etapa (c), quando os substratos estabilizam a temperatura e o pH, é adicionada a enzima selecionada em uma concentração E:S variando de 1:50 a 1:200 de protease. Segue-se então para a etapa (d), que é a realização do processo de hidrólise e tem a duração de 2 a 3 horas. Estas condições de E:S e tempo de reação de hidrólise foram mensuradas de acordo com um planejamento experimental, realizado anteriormente. Portanto, foram selecionadas as condições que resultaram em maior faixa de grau de hidrólise (GH) do substrato e rendimento proteico na fração solúvel. Estes parâmetros foram considerados como ótimos para a produção do hidrolisado proteico de vísceras caprinas utilizando proteases comerciais. Durante a reação de hidrólise, o pH é mantido constante através da adição da solução de NaOH e o consumo de base é monitorado, sendo o grau de hidrólise definido pela Equação 1 (ADLER-NISSEN, 1986):

$$GH (\%) = B * N_b * (1/\alpha) * (1/MP) * (1/h_{tot}) * 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que: GH (%) = grau de hidrólise; B = consumo de base em mL; N_b = normalidade da base; $1/\alpha$ = média de grau de dissociação do grupo α -NH₂; MP = massa da proteína em g; h_{tot} = número total de ligações peptídicas no substrato proteico, sendo 7,6 para carnes (ADLER-NISSEN, 1986).

[021] Finalizada a reação de hidrólise, as enzimas são inativadas (etapa e) por aquecimento da mistura cujas temperaturas são de 85 °C a 90 °C por 10 a 15 minutos, seguida de resfriamento em água em temperatura ambiente. Depois de inativadas as enzimas e resfriadas, os hidrolisados protéicos são centrifugados (etapa f) para separação da fração sólida e solúvel resultante da hidrólise enzimática. Uma camada lipídica é identificada na parte superficial do produto e pode ser facilmente retirada por filtração para adição à fração sólida. A fração solúvel contém o hidrolisado de menor tamanho. Tanto a camada lipídica e o precipitado formado, são separados e adicionados de conservantes para uso como ingrediente para formulações de alimentos para animais de pequeno porte (etapa g). A fração solúvel é desidratada (etapa g), e depois de seco, o hidrolisado proteico em pó a partir de vísceras caprinas é coletado e armazenado (etapa h).

REIVINDICAÇÕES

1) **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO FRACIONADO PREPARADO A PARTIR DE VÍSCERAS CAPRINAS**

Caracterizado por um processo de produção de hidrolisados protéicos líquidos, pastosos e/ou em pó, a partir de vísceras caprinas e enzimas proteolíticas comerciais, que podem ser utilizados tanto na elaboração de produtos nutricionalmente modificados, quanto como funcionalidade tecnológica aplicada a outros produtos, obtenção de novos produtos alimentícios, entre outros e correspondem as seguintes etapas:

- a) Lavagem, moagem e homogeneização das vísceras caprinas;
- b) Preparo do substrato (ajuste do pH e Temperatura de acordo com a enzima utilizada);
- c) Adição da enzima;
- d) Hidrólise enzimática do substrato preparado;
- e) Inativação térmica da enzima (temperatura/tempo);
- f) Centrifugação para separação das frações resultante da hidrólise enzimática, de acordo com a densidade;
- g) Liofilização (secagem) do sobrenadante ou adição de conservantes para as frações pastosas ou líquidas;

- h) Obtenção do hidrolisado protéico líquido, pastoso ou em pó, preparado a partir de vísceras caprinas.

2) **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO FRACIONADO PREPARADO A PARTIR DE VÍSCERAS CAPRINAS** de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado** pelo fato de que na etapa a e b, o substrato utilizado compreende vísceras caprinas selecionadas como o coração, pulmão e fígado.

3) **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO FRACIONADO PREPARADO A PARTIR DE VÍSCERAS CAPRINAS** de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que na etapa a, a moagem é realizada com a finalidade de aumentar a superfície de contato do substrato, e pode ser utilizado um moinho de carnes, um triturador ou outro equipamento destinado para este fim.

4) **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO FRACIONADO PREPARADO A PARTIR DE VÍSCERAS CAPRINAS** de acordo com as reivindicações de 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que na etapa b, c e d, as enzimas utilizadas são proteases.

5) **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO FRACIONADO PREPARADO A PARTIR DE VÍSCERAS CAPRINAS** de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de usar uma proporção de enzimas:substrato (E:S) numa faixa de 1:50 a 1:200.

6) **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO FRACIONADO PREPARADO A PARTIR DE VÍSCERAS CAPRINAS** de acordo com a reivindicação 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que na etapa d, a hidrólise enzimática ser realizada na faixa de temperatura de 55 °C a 70 °C e pH entre 5,5 a 8,0.

7) **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO FRACIONADO PREPARADO A PARTIR DE VÍSCERAS CAPRINAS** de acordo com a reivindicação 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que na etapa d, a hidrólise enzimática ocorre num período entre 1 a 4 horas.

8) **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO FRACIONADO PREPARADO A PARTIR DE VÍSCERAS CAPRINAS** de acordo com a reivindicação 1 a 7, caracterizado pelo fato de que na etapa e, a inativação da enzima ocorre pelo aumento da temperatura, entre 80 °C a 95 °C por período de tempo entre 5 a 30 minutos.

9) **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO FRACIONADO PREPARADO A PARTIR DE VÍSCERAS CAPRINAS** de acordo com a reivindicação 1 a 8, caracterizado pelo fato de que na etapa f, após centrifugação obtemos 3 (três) fases respectivamente: fase lipídica, fase solúvel e o precipitado, de acordo com a densidade.

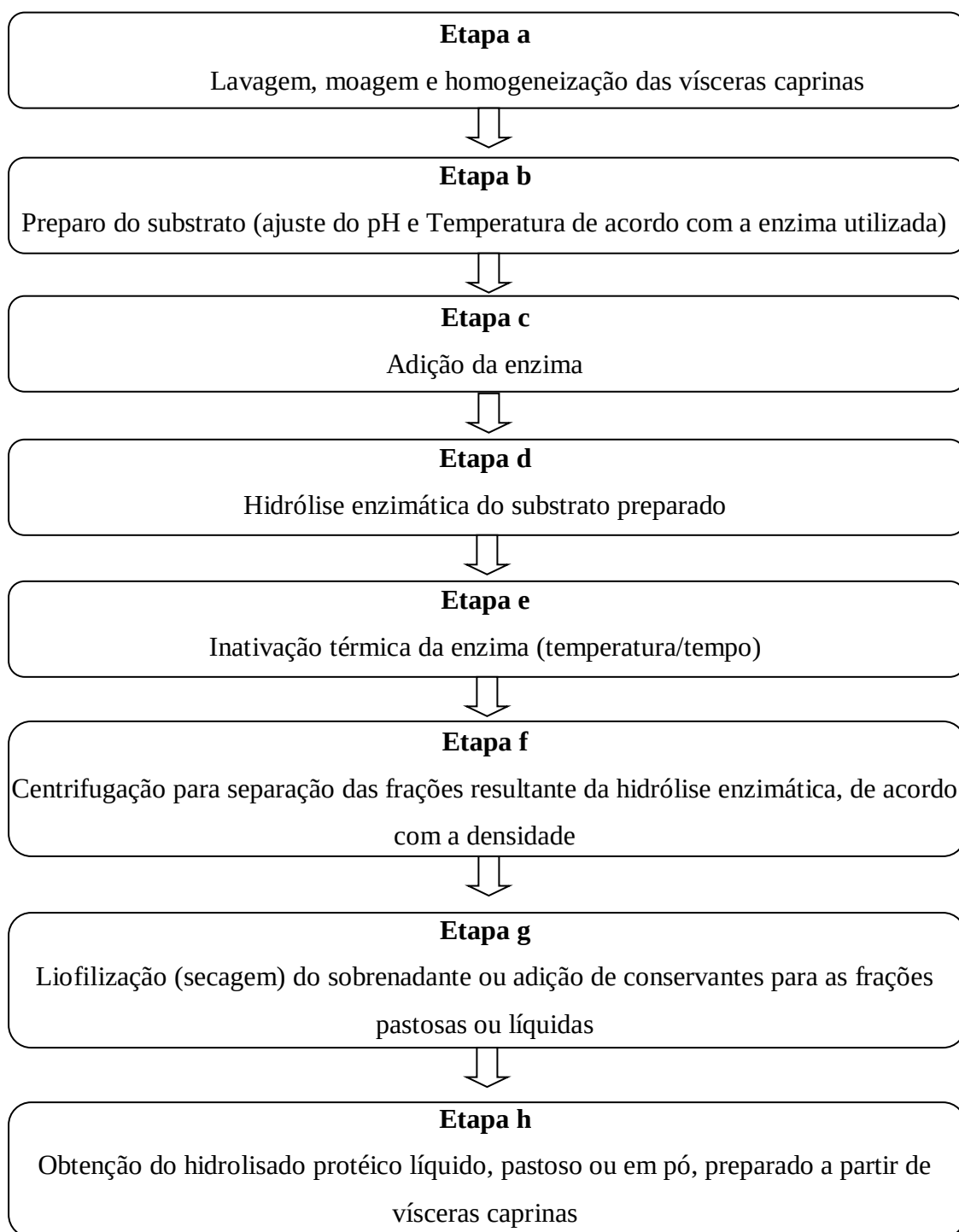
10) **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO FRACIONADO PREPARADO A PARTIR DE VÍSCERAS CAPRINAS** de acordo com a reivindicação 1 a 9, caracterizado pelo fato de que na etapa f, ocorre a separação da fração solúvel, sendo a fração lipídica retirada por filtração e adicionada ao precipitado.

11) **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO FRACIONADO PREPARADO A PARTIR DE VÍSCERAS CAPRINAS** de acordo com a reivindicação 1 a 10, caracterizado pelo fato de que na etapa g, é utilizado o equipamento de liofilização para secagem do hidrolisado proteico.

12) **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO FRACIONADO PREPARADO A PARTIR DE VÍSCERAS CAPRINAS** de acordo com a reivindicação 1 a 11, caracterizado pelo fato de que na etapa g, conservantes são utilizados para manutenção das qualidades de consumo do produto evitando a proliferação indesejável de microorganismo.

13) **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO FRACIONADO PREPARADO A PARTIR DE VÍSCERAS CAPRINAS** caracterizado pelo fato de que compreendem ao processo descrito em qualquer uma das reivindicações de 1 a 12 e apesar de existir alguns processos e produtos que apresentam características semelhantes, as diferenças estão na escolha da proteína

utilizada, a enzima e o processamento que são determinantes na aplicação do hidrolisado proteico obtido, e o hidrolisado proteico pode ser utilizado tanto na elaboração de produtos nutricionalmente modificados, quanto como funcionalidade tecnológica aplicada a outros produtos, obtenção de novos produtos alimentícios, entre outros.

**FIGURA 1**

RESUMO

A presente invenção intitulada “Processo de obtenção de hidrolisado protéico fracionado preparado a partir de vísceras caprinas” refere-se a um processo de preparação de um hidrolisado protéico, preparado a partir de vísceras caprinas. O produto é obtido a partir dos subprodutos do abate de caprino e pode ser utilizado pelas indústrias de alimentos e rações para pequenos animais (pets), por possuir várias propriedades funcionais tecnológicas e sensoriais, com potencial de ser incorporado a uma grande amplitude de produtos alimentícios.

Inventores

Inventor (es)

1. Nome: Marta Suely Madruga

Qualificação: Doutora

CNPJ/CPF: 308.987.734-15

Endereço completo: Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia de Alimentos, Laboratório de Análises Químicas de Alimentos, Campus I, João Pessoa, Paraíba.

CEP: 58091-100

Telefone: +55 83 3216-7576

E-mail: msmadruga@uol.com.br

2. Nome: Angela Lima Meneses de Queiroz

Qualificação: Doutoranda

CNPJ/CPF: 008.086.614-00

Endereço completo: Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia de Alimentos, Laboratório de Análises Químicas de Alimentos, Campus I, João Pessoa, Paraíba.

CEP: 58091-100

Telefone: +55 83 3216-7576

E-mail: angelalimas@gmail.com

3. Nome: Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Qualificação: Doutora

CNPJ/CPF: 102.029.328-42

Endereço completo: Instituto de Tecnologia de Alimentos, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Governo do Estado de São Paulo.

CEP: 13070-078

Telefone: +55 19 3289-5259

E-mail: mtb@ital.sp.gov.br

4. Nome: Maria Manuela Estevez Pintado

Qualificação: Doutora

NIF: 195470583

Endereço completo: Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa. Rua Arquiteto Lobão Vital, Apartado 2511, Porto/ Portugal.

CEP: 4202-401

Telefone: +351 225580097

E-mail: mpintado@porto.ucp.pt

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As vísceras caprinas constituem matérias-primas com potencial de utilização na produção de novos produtos alimentares ou ingredientes devido a sua qualidade nutricional e, mais importante, ao seu perfil proteico. As proteínas presentes nas vísceras caprinas (coração, fígado e pulmão) podem ser clivadas por hidrólise enzimática para produzir hidrolisados com amplas aplicações tecnológicas, conforme demonstraram as análises de hidrofobicidade, perfis electroforéticos e de aminoácidos totais realizadas com estas vísceras.

Os hidrolisados de proteínas de vísceras caprinas, obtidos por via enzimática, apresentaram excelente qualidade nutricional, com alto teor protéico e perfil aminoácido equilibrado, estando presentes todos os aminoácidos essenciais. Estes hidrolisados mostraram propriedades funcionais tecnológicas significativas, tais como solubilidade, capacidade de retenção de óleo, propriedades emulsionantes e estabilidade da emulsão, além da atividade antioxidante, com potencial para aplicação como ingrediente funcional em vários produtos da indústria alimentar.

Sugere-se que estudos futuros sejam realizados, explorando melhor o potencial tecnológico e nutraceutico dos hidrolisados proteicos de vísceras caprinas, a exemplo de sua utilização como agente flavorizante para produtos cárneos processados; potencial como agente antimicrobiano; além de estudos sobre sua estrutura microscópica, sobre seu sequenciamento de peptídeos e aminoácidos, os quais possam indicar com precisão sua aplicação industrial.

Além disso, a pesquisa realizada, incentiva, de forma direta, um melhor aproveitamento dos subprodutos do abate caprino, contribuindo para o desenvolvimento da caprinocultura por diversificar os produtos derivados oferecidos ao mercado consumidor.

ANEXOS

**CERTIFICADOS DE TRADUÇÃO E SUBMISSÃO DOS ARTIGOS e
DEPÓSITO DE PATENTE**

ARTIGO 1:

CARTA DE SUBMISSÃO

Thank you for your submission to LWT - Food Science and Technology Entrada x

 **LWT - Food Science & Technology** <eesserver@eesmail.elsevier.com> 25 de jan (Há 5 dias) ☆ ↩

para mim, angelalimas ▾

 inglês ▾ > português ▾ [Traduzir mensagem](#) [Desativar para: inglês x](#)

Dear Ms. Lima M Queiroz,

Thank you for sending your manuscript POTENTIAL USE OF GOAT VISCERA TO OBTAIN PROTEIN HYDROLYSATES for consideration to LWT - Food Science and Technology. Please accept this message as confirmation of your submission.

When should I expect to receive the Editor's decision?
We publicly share the average editorial times for LWT - Food Science and Technology to give you an indication of when you can expect to receive the Editor's decision. These can viewed here: http://journalinsights.elsevier.com/journals/0023-6438/review_speed

What happens next?
Here are the steps that you can expect as your manuscript progresses through the editorial process in the Elsevier Editorial System (EES).

1. First, your manuscript will be assigned to an Editor and you will be sent a unique reference number that you can use to track it throughout the process. During this stage, the status in EES will be "With Editor".
2. If your manuscript matches the scope and satisfies the criteria of LWT - Food Science and Technology, the Editor will identify and contact reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer-review is a voluntary service, it can take some time but please be assured that the Editor will regularly remind reviewers if they do not reply in a timely manner. During this stage, the status will appear as "Under Review".
3. It is also possible that the Editor may decide that your manuscript does not meet the journal criteria or scope and that it should not be considered further. In this case, the Editor will immediately notify you that the manuscript has been rejected and may recommend a more suitable journal.

Once the Editor has received the minimum number of expert reviews, the status will change to "Required Reviews Complete".

CERTIFICADO DE TRADUÇÃO

 **AMERICAN JOURNAL EXPERTS**

EDITORIAL CERTIFICATE

This document certifies that the manuscript listed below was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts.

Manuscript title:

Potencialidade de vísceras caprinas para obtenção de hidrolisados proteicos

Authors:

Angela Lima Meneses de Queiroz, Ana Rita Ribeiro de Araújo, Carlos Alberto de Almeida Gadelha, Tatiane Santi Gadelha, Maria Teresa Bertoldo Pacheco, Marta Suely Madruga

Date Issued:

January 9, 2017

Certificate Verification Key:

E241-98A7-B5FB-4E7E-C449



This certificate may be verified at www.aje.com/certificate. This document certifies that the manuscript listed above was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process. Documents receiving this certification should be English-ready for publication; however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns about this edited document, please contact American Journal Experts at support@aje.com.

American Journal Experts provides a range of editing, translation and manuscript services for researchers and publishers around the world. Our top-quality PhD editors are all native English speakers from America's top universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. For more information about our company, services and partner discounts, please visit www.aje.com.

ARTIGO 2:

CARTA DE SUBMISSÃO

Submission FBIO_2017_25 received by Food Bioscience Entrada x


Food Bioscience <Evisesupport@elsevier.com>
 para mim

25 de jan (Há 5 dias) ☆

inglês > português Traduzir mensagem

Desativar para: inglês x

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: FBIO_2017_25
 Title: FUNCTIONAL PROTEIN HYDROLYSATE FROM GOAT BY-PRODUCTS: OPTIMIZATION AND CHARACTERIZATION STUDIES
 Journal: Food Bioscience

Dear Ms. Lima M Queiroz,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Food Bioscience. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evises.com/evises/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=FBIO and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Food Bioscience

Have questions or need assistance?
 For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

CERTIFICADO DE TRADUÇÃO




English Consulting Brazil

November 8th, 2016

To Whom It May Concern,

This is to declare that I, Christopher James Quinn, a professional Native Canadian English teacher, editor, and translator for English Consulting Brazil, have reviewed and edited the article submitted for publication in your journal entitled "FUNCTIONAL PROTEIN HYDROLYSATE FROM GOAT VISCERA: OPTIMIZATION AND CHARACTERIZATION STUDIES" for structure, grammar, punctuation, spelling, word choice, and readability. If you have any questions, concerns, or doubts regarding the review/editing, please contact me at: englishconsultingbrazil@gmail.com.

Thank you and kind regards,



Christopher J. Quinn
 Teacher, Editor, Portuguese to English Translator, English Consultant
 ECB – English Consulting Brazil
 Natal, RN, Brazil

ECB – English Consulting Brazil
 CNPJ: 15.156.534/0001-89
 Natal - RN

PATENTE:

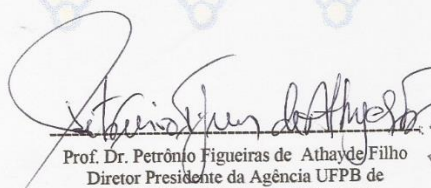
**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA
REITORIA
AGÊNCIA UFPB DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
NÚCLEO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA – REDE NIT-NE**

DECLARAÇÃO

Declaro para fins comprobatórios que, **Marta Suely Madruga (CPF: 308.987.734-15); Angela Lima Meneses de Queiroz (CPF: 008.086.614-00); Maria Teresa Bertoldo Pacheco (CPF: 102.029.328-42); Maria Manuela Estevez Pintado (CPF: 195.470.583)** entraram com um pedido de PATENTE DE INVENÇÃO neste Núcleo de Inovação Tecnológica – NIT, denominado **“PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO FRACIONADO PREPARADO A PARTIR DE VÍSCERAS CAPRINAS”**. 2015. Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número Definitivo: BR102015023135-0. Data de Depósito: 08/09/2015 e que o mesmo se encontra em fase de tramitação no âmbito do Instituto Nacional de Propriedade Industrial e desta Agência de Inovação Tecnológica da UFPB.

Ressalta-se que o referido pedido de PATENTE DE INVENÇÃO encontra-se sob **SIGILO** conforme Lei Nº 9.279/96.

João Pessoa – PB, 07 de junho de 2015.


Prof. Dr. Petronio Figueiras de Athayde Filho
Diretor Presidente da Agência UFPB de
Inovação Tecnológica / INOVA-UFPB
SIAPE 1227933

Prof. Dr. Petronio Figueiras de A. Filho
Diretor Presidente da Agência UFPB de
Inovação Tecnológica / INOVA-UFPB
SIAPE 1227933

Cidade Universitária – Campus I – Prédio da Reitoria, 3º Andar. CEP: 58051-900E-mail:
inova@reitoria.ufpb.br / www.ufpb.br/inova - Fone: (83) 3216.7558

