

## Hidrólise Enzimática de vísceras de Frango

## Enzymatic hydrolysis of Chicken Viscera

**Tatiane Francini Knaul**

[tatianeknaul@gmail.com](mailto:tatianeknaul@gmail.com)

Universidade Tecnológica e Federal  
do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

**SchalineWinckAlberti**

[schaline\\_swa@hotmail.com](mailto:schaline_swa@hotmail.com)

Universidade Tecnológica e Federal  
do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

**Ana Maria Vélez**

[velez.ana@gmail.com](mailto:velez.ana@gmail.com)

Universidade  
Tecnológica e Federal do Paraná,  
Toledo, Paraná, Brasil

### RESUMO

Dentro dos diversos processos industriais tem-se a necessidade da destinação dos subprodutos gerados pela agroindústria, as vísceras de frango, por exemplo, podem ser incorporadas juntamente com outras substâncias e destinadas para a produção de ração animal. Na indústria de ração animal observa-se a oportunidade da utilização de enzimas como sendo substâncias que catalisam e aceleram a velocidade da reação e que podem ser usadas no processo de hidrólise. A hidrólise enzimática modifica as propriedades químicas, físicas e biológicas das proteínas, podendo melhorar suas características nutricionais e funcionais. As enzimas têm alto custo, no entanto, permitem que as reações sejam operadas sob condições brandas de trabalho, evitando formação de subprodutos e conduzindo a maiores rendimentos. Neste estudo utilizou-se o processo de hidrólise enzimática de proteína a partir de vísceras de frango a fim de obter-se um caldo rico que posteriormente poderia ser utilizado na alimentação de aves. Durante o procedimento variou-se quatro parâmetros fundamentais para a atividade enzimática da lipase sendo estes: tempo 1, 3, 5 e 7 minutos, temperatura entre 27°C, 37°C e 47°C, pH 6, 7 e 8, e razão enzima substrato 5, 10 e 15 mg/mL para encontrar os melhores parâmetros que satisfazem a atividade enzimática, os quais foram 1 min, 37 °C, pH 7, razão enzima/substrato 5 mg/mL obtendo 9,8 U/mg sendo esta quantidade de ácido graxo liberado pela atividade da enzima. Foi feita uma caracterização das enzimas envolvidas no processo a partir de uma eletroforese SDS-PAGE, encontrando lipases com peso molecular de 34 kDa aproximadamente.

**PALAVRAS-CHAVE:** Hidrólise enzimática, enzimas, ração animal.

### ABSTRACT

Within the various industrial processes there is a need for the destination of the by-products generated by the agroindustry, the chicken viscera, for example, can be incorporated together with other substances and destined for the production of animal feed. In the animal feed industry the use of enzymes as catalysts and accelerates the rate of the reaction and can be used in the hydrolysis process is observed. Enzymatic hydrolysis modifies the chemical, physical and biological properties of proteins and can improve their nutritional and functional characteristics. Enzymes are costly, however, allowing the reactions to be operated under soft working conditions, avoiding by-products formation and leading to higher yields. In this study the enzymatic hydrolysis of protein from chicken viscera was used in order to obtain a rich broth that could later be used to feed poultry. During the procedure four fundamental parameters for the enzymatic activity of lipase were varied: time 1, 3, 5 and 7 minutes, temperature between 27 °C, 37 °C and 47 °C, pH 6, 7 and 8, and 5, 10 and 15 mg / mL substrate enzyme to find the best parameters that satisfy the enzymatic activity, which were 1 min, 37 °C, pH 7, enzyme/substrate ratio 5 mg/mL, obtaining 9.8 U/mg being this quantity of fatty acid released by the activity of the enzyme. A characterization of the enzymes involved in the process was done from an SDS-PAGE electrophoresis, finding lipases with molecular weight of about 34 kDa.

**KEYWORDS:** Enzymatic hydrolysis, enzymes, animal feed.

**Recebido:** 25 de out 2018.

**Aprovado:** 04 de out de 2018.

#### Direito autoral:

Este trabalho está licenciado sob os  
termos da Licença  
Creative Commons-Atribuição 4.0  
Internacional.



## INTRODUÇÃO

A atividade agrícola vem se destacando nos últimos anos, principalmente pela necessidade de utilização de algum tipo de proteína de origem animal na alimentação humana. A partir desse conceito pode-se observar que a demanda de suplementos alimentares aumentou nos últimos tempos principalmente porque a população passa de 7 bilhões de pessoas, com isso a produção avícola ganha mais importância (SINHORINI, R. Maria, 2013). Em 2016 o Brasil manteve a posição de maior exportador mundial e segundo maior produtor de carne de frango, ficando atrás somente dos Estados Unidos (ABPA).

Os principais resíduos gerados no abate de frangos são as vísceras, penas, pés, cabeça, sangue e gorduras que não servem para o consumo humano e sem fim comercial. Muitos desses produtos são destinados para diversas atividades sendo elas fertilizantes utilizados na agroindústria, locais de tratamento de efluentes, biogás (FEISTEL, Janaina 2011). Uma forma segura de reaproveitar estes ingredientes é retorná-lo para a cadeia produtiva na forma de ração animal, sendo elas, farinha de penas, sangue ou vísceras. Considera-se importante ressaltar que a alimentação representa alto custo de produção, tornando-se necessário a implantação de medidas que possam reduzir o valor agregado e consequentemente e aumentar o lucro no setor.

Dentro dos diversos métodos empregados a hidrólise enzimática é o mais utilizado, este processo pode ser compreendido como a clivagem enzimática das moléculas de proteínas em pequenos peptídeos de tamanhos diversos e, eventualmente, em aminoácidos (KUROSAWA, Louise 2008). Este método permite que os aminoácidos termosensíveis possam estar presentes na solução sendo possível convertê-los em ingredientes funcionais. Neste estudo, utilizou-se um mix enzimático e realizou-se uma análise para determinar as melhores condições da enzima, variou-se temperatura, pH e razão enzima substrato. Determinou-se também a atividade enzimática e fez-se o gel de eletroforese.

## MÉTODOS

### Padronização da amostra

Solicitou-se amostras de vísceras de frango na Cooperativa Copagril na cidade Marechal Cândido Rondon as quais foram armazenadas moídas e congeladas. Após fez-se o descongelamento e postas em estufa a 60°C. Para a realização dos experimentos foi utilizado o mix enzimático em pó “digestiveenzymes” da marca Allmax com 150 U de lipase segundo o fabricante.

### Atividade enzimática da lipase

Preparou-se o substrato com 30 mL de água destilada, 30 g de vísceras de frango e 30 mL de goma arábica a 7% (p/v). Adicionou-se 5 mL de substrato, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e 1 mL da solução enzimática (5mg/mL) em erlenmeyer de 125 mL. Estes frascos foram incubados a 37°C nos tempos de 5, 10, 20 e 30 min, em shaker com agitação a 100 rpm. Após o tempo de incubação parou-se a reação com adição de 15 mL de uma mistura de acetona

e etanol (1:1). Em seguida titulou-se com solução de KOH 0,02 M, utilizando fenolftaleína como indicador, conforme metodologia Soares et al (1999).

Para cada análise realizou-se um branco. Os cálculos foram realizados de acordo com a equação 1:

$$U(\text{moles}(\text{mg min})^{-1}) = \frac{(V_a - V_b)MD10^6}{T_m} \quad (1)$$

Sendo:

D: diluição da amostra;

M: concentração da solução de KOH (M);

m: massa de enzimas (miligramas);

T: tempo de reação (min);  $V_a$ : volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL);

$V_b$ : volume de KOH gasto na titulação do branco (mL).

### Planejamento experimento para a determinação da hidrólise enzimática das vísceras de frango

Procedeu-se alguns experimentos a 37°C variando o tempo (1,3,5 e 7 min) e a proporção vísceras e H<sub>2</sub>O (g:mL) da seguinte forma 1:1, 1:2 e 3:2. A quantidade de água e goma arábica foram as mesmas. Seguindo com os melhores resultados, foram realizados experimentos com condições reacionais brandas de temperatura e pH apropriadas para as enzimas. Realizou-se um planejamento variando pH (6,7,8), temperatura (27, 37, 47)°C e a solução enzimática (5,10 e 15) Mg/ml.

### Caracterização de Enzimas - Lipase

Segundo a metodologia de SPEROTTO, 2014 fez-se 45 mL de gel de corrida 9% com a seguinte composição: 14,64 mL de acrilamida/Bisacrilamida 30%; 18,48 mL de água destilada; 11,25 mL de 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 450 uL de SDS 10%; 22,5 uL de Temed e 225 uL de PSA 10%. Posteriormente preparou-se 15 mL do gel de empilhamento com a seguinte composição: 1,98 mL de deacrilamida/Bisacrilamida 30%; 3,78 mL de 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 150 uL SDS 10%; 9 mL de água destilada; 15 uL de Temed e 75 uL de PSA 10%. Transferiu-se o gel de empilhamento para a placa de vidro até cobrir o pente. Descansou-se por 30 min.

No preparo das amostras realizou-se 2 diluições 1:10 e 1:100 das soluções fornecidas pelo laboratório. Adicionou-se 100 uL de solução enzimática pura das 2 diluições, separadamente, em eppendorfs. Juntou-se, em seguida, 100 uL de tampão de amostra e levou-se para banho-maria a 100 °C por 5 min. Centrifugou-se por 10 min a 5000 rpm. Após acrescentou-se 5 uL de beta-mercaptoetanol a cada uma das amostras. A corrida do gel de eletroforese ocorreu a 200 V e 80 mA durante 6 horas no tampão de corrida.

## RESULTADOS

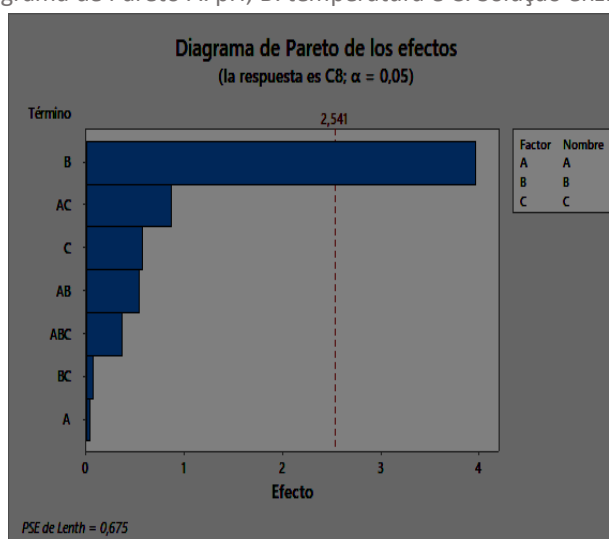
Na determinação da atividade enzimática da lipase notou-se que ao realizar o cozimento das vísceras de frango em uma temperatura aproximadamente 100°C não foi eficaz, este fato pode ser compreendido devido a que as altas

temperaturas inativam as lipases. Já com as vísceras cruas os parâmetros que melhor satisfazem a hidrólise foram de 1 min, 37 °C, pH 7, razão enzima/substrato 5 mg/mL obtendo 9,8 U/mg, nas condições do ensaio.

Afim de analisar mais profundamente os dados e sua significância, foram realizados os cálculos da superfície de resposta do planejamento fatorial  $2^3$  a partir do software Minitab. Foram obtidos os resultados do diagrama de Pareto - figura 1 para avaliar os parâmetros pH (A), temperatura (B) e solução enzimática (C) e a interação entres eles e um gráfico de superfície resposta – figura 2.

Segundo os resultados da figura 1, observa-se que apenas a variabilidade da temperatura foi significativa, logo as variações dos outros parâmetros não influenciam diretamente o processo de hidrólise.

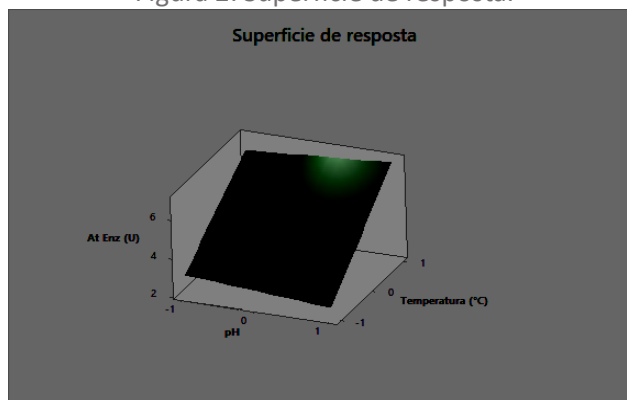
Figura 1 – Diagrama de Pareto A: pH; B: temperatura e C: Solução enzimática



Fonte: Autor.

Na superfície de resposta da figura 2 é representada a tendência ao aumento da atividade enzimática conforme aumenta a temperatura, também pode ser observado que a variação do pH não influencia a hidrólise enzimática este fato pode ser compreendido porque a variação de intervalo não proporcionou uma deformação na estrutura da enzima, como já foi apresentado no diagrama de Pareto. A faixa de temperatura a ser pesquisada em futuros experimentos pode ser um pouco maior, respeitando sempre a natureza de inativação enzimática a altas temperaturas devido a que as enzimas utilizadas não são termorresistentes.

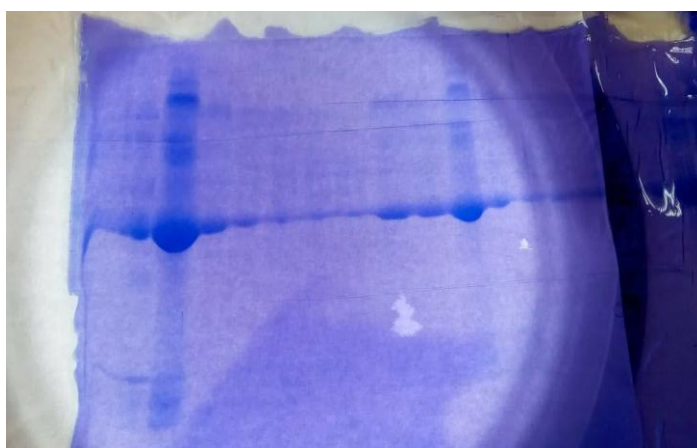
Figura 2: Superfície de resposta.



Fonte: autor.

O gel utilizado para a eletroforese SDS-PAGE é constituído por uma matriz polimérica de acrilamida com ligações cruzadas de N, N-metil-bis-acrilamida, este é amplamente usado para separação de proteínas pois quando preparado em diferentes concentrações, permite uma modificação da rede entrecruzada formada durante sua polimerização. Quanto maior a concentração de acrilamida menores serão os poros formados na malha do gel, podendo assim realizar a separação e quantificar o peso molecular (FRANKEN, Gomes 2007). No trabalho em estudo utilizou-se dessa técnica para caracterizar as enzimas presente no mix enzimático encontrando lipases com um peso molecular de 34 kDa aproximadamente. A corrida pode ser observada na figura 3.

Figura 3: Gel de SDS-Page 9%. (1) Peso molecular em kDa. Mix enzimático: (2) 10 mg/mL (3) 1 mg/mL (4) 0,1 mg/mL (5) 0,01 mg/mL (6) e (7) 0,001 mg/mL



Fonte: autor.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que para estudos futuros com vísceras de frango com as enzimas utilizadas neste estudo, poderá ser pesquisada a otimização dos resultados de



hidrolise aumentando a temperatura mínimo do planejamento de experimentos, devido a que a faixa de temperaturas ótima está um pouco mais acima do que a utilizada neste projeto. A partir do planejamento de experimentos nota-se que a variação de pH e concentração enzimática não afetam os resultados da hidrolise.

## REFERÊNCIAS

SINHORINI, R. Maria. Processo de produção de farinha de penas hidrolisadas: estudos de otimização do teor protéico e do valor de digestibilidade da proteína. Dissertação de mestrado, apresentada ao Curso de Mestrado Profissionalizante em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Londrina 2013.

ABPA. Relatório Anual ABPA 2017. São Paulo, SP, 2017. 15p.

FEISTEL, C. Janaina. Tratamento e destinação de resíduos e efluentes de matadouros e abatedouros. Seminário apresentado junto à Disciplina Seminários aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás 2011.

KUROZAWA, Louise et al. Influência das condições de processo na cinética de hidrólise enzimática de carne de frango. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas - SP, 2008.

FRANKEN, Luiz Paulo Gomes. Avaliação da atividade de lipases em propano pressurizado. URI – Campus Erechim, Departamento de ciências agrárias, Programa de mestrado em Engenharia de Alimentos. Erechim – RS, 2007.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore sílica. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 77-79, n. 2, p. 745-757, 1999.

SPEROTTO, Raul Antonio. Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana. Editora Univates, 1º ed. Lajeado, 2014.