

ELIZA AUGUSTA ROLIM BIASUTTI

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO SORO DE
LEITE PARA OBTER ELEVADO TEOR DE
OLIGOPEPTÍDEOS: UTILIZAÇÃO DA
SUBTILISINA E DA PANCREATINA**

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo horizonte, MG
2006**

ELIZA AUGUSTA ROLIM BIASUTTI

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO SORO DE
LEITE PARA OBTER ELEVADO TEOR DE
OLIGOPEPTÍDEOS: UTILIZAÇÃO DA
SUBTILISINA E DA PANCREATINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Marialice Pinto Coelho Silvestre

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2006**

*Dedico este trabalho aos meus pais, Rubens e Mazza,
aos meus irmãos Angélica e Eugênio, a tia Margô
e a todos que me apoiaram.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade da vida.

À Professora Dra. Marialice Pinto Coelho Silvestre, por ter me recebido de braços abertos no laboratório, pela orientação deste trabalho, pela confiança, amizade, incentivos e pelo exemplo de profissionalismo e dedicação pela pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Virgílio Coelho, pela disposição de ensinar, incentivo e serenidade.

Aos Professores Dr. Sergio Duarte Segall, Dr. Devid Lee Nelson e Dr. Amintas Fabiano de S. Figueiredo pelas importantes contribuições na elaboração deste trabalho.

Aos professores e a coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos pela contribuição na minha formação científica e na realização deste estudo.

Às funcionárias da secretaria de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Úrsula e Marilene pela boa vontade em ajudar sempre, e ao funcionário Marcos pela constante convivência e presteza.

Especialmente, aos meus pais, Rubens e Mazza, pelo apoio e confiança em todos os momentos da minha vida, amo vocês.

Aos meus irmãos, Angélica e Eugênio, e a tia Margô, pelo carinho, apoio, amor e amizade.

A todos os amigos do Laboratório, e as meninas da nutrição, pela convivência diária e ajuda constante na realização deste trabalho, pela amizade e momentos de descontração.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Nos campos da observação, o acaso favorece
apenas as mentes preparadas”.

(Louis Pasteur)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE SIGLAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO	13
REVISÃO DA LITERATURA	15
1 Soro de leite – dados relevantes.....	15
1.1 As proteínas do soro.....	16
1.1.1 β -lactoglobulina	18
1.1.2 α -lactalbumina	18
2 Hidrólise Enzimática de Proteínas	19
2.1 Importância	19
2.2 Fatores interferentes	21
2.2.1 Natureza da enzima	21
2.2.2 Tratamento térmico do substrato.....	23
2.2.3 Relação enzima: substrato	25
2.3 Proteases	25
2.3.1 Subtilisina	26
2.3.2 Pancreatina	27
3 Importância nutricional os hidrolisados protéicos.....	28
4 Métodos de caracterização do perfil peptídico de hidrolisados protéicos	30
TRABALHO EXPERIMENTAL	32
APRESENTAÇÃO	32

CAPÍTULO I - UTILIZAÇÃO DA SUBTILISINA NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE PARA OBTER ELEVADO TEOR DE OLIGOPEPTÍDEOS	34
CAPITULO II - UTILIZAÇÃO DA PANCREATINA NA HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE PARA OBTER ELEVADO TEOR DE OLIGOPEPTÍDEOS	54
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	74
OUTRAS PUBLICAÇÕES.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela I.1 - Condições hidrolíticas empregadas no preparo de hidrolisados protéicos de soro de leite.....	40
Tabela I.2 - Composição química do soro de leite.....	41
Tabela I.3 - Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados de soro de leite obtidos pela ação da subtilisina.	44

Capítulo II

Tabela II.1 - Condições hidrolíticas empregadas no preparo de hidrolisados protéicos de soro de leite.	60
Tabela II.2 - Composição química do soro de leite.....	61
Tabela II.3 - Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados de soro de leite obtidos pela ação da pancreatina.....	64

LISTA DE FIGURAS

Trabalho experimental

Figura 1– Principais etapas do trabalho experimental.....33

Capítulo I

Figura I.1 - Perfil cromatográfico do hidrolisado S1 a 230 nm.....43

Figura I.2: Efeito da concentração do substrato sobre o perfil peptídico de hidrolisados de soro de leite.....46

Figura I.3 - Efeito da relação E:S sobre o perfil peptídico de hidrolisados de soro de leite.47

Figura I.4 - Efeito do tempo de hidrólise sobre o perfil peptídico de hidrolisados de soro de leite.....49

Capítulo II

Figura II.1 - Perfil cromatográfico do hidrolisado P1 a 230 nm.....63

Figura II.2 - Efeito da concentração do substrato sobre o perfil peptídico de hidrolisados de soro de leite.....66

Figura II.3 - Efeito da relação E:S sobre o perfil peptídico de hidrolisados de soro de leite.....67

Figura II.4 - Efeito do tempo de hidrólise sobre o perfil peptídico de hidrolisados de soro de leite.....69

LISTA DE SIGLAS / ABREVIATURAS

α-La	α -lactalbumina
ACF	Área Corrigida da Fração
AE - HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica
β-Lg	β -lactoglobulina
DBO	Demanda biológica de oxigênio
EDS	Espectrofotometria Derivada Segunda
E:S	Relação entre a quantidade de enzima e do substrato
FAO	Food and Agriculture Organization
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IG-F	Imunoglobulina F
PHEA	Poli (2-hidroxietil-aspartamido)-sílica
PF-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
SEC	Cromatografia de exclusão molecular
SE-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida-sódio dodecil sulfato
UF	Ultrafiltração
WHO	World Health Organization

RESUMO

Os hidrolisados enzimáticos de proteínas são amplamente utilizados em pacientes com necessidades nutricionais e fisiológicas particulares, uma vez que apresentam inúmeras vantagens em relação às misturas de aminoácidos livres e às proteínas intactas. O valor nutricional dos hidrolisados protéicos está relacionado ao teor de di- e tripeptídeos sendo que, quanto mais elevado este teor, maior a qualidade do produto final. O objetivo deste trabalho foi obter hidrolisados protéicos de soro de leite ricos em di- e tripeptídeos, bem como em peptídeos médios (500Da) e com baixo teor de grandes peptídeos (>1000Da) e de aminoácidos livres, empregando-se uma subtilisina e uma pancreatina, isoladamente. Para isso, foram otimizadas as etapas do processo, visando, também, a redução de custos para adaptação em escala industrial. A análise do perfil peptídico destes hidrolisados foi realizada pelo fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC), seguida pela quantificação dos peptídeos e aminoácidos livres pelo método da Área Corrigida da Fração. Assim, utilizando-se a subtilisina, o melhor perfil peptídico foi obtido ao se empregar 15% de substrato, relação enzima:substrato de 1:100 e 5h de reação, apresentando um teor de oligopeptídeos de 41,42%. Já, para a pancreatina, a concentração do substrato de 10%, a relação enzima: substrato de 4:100 e o tempo de reação de 10h propiciou o melhor resultado, tendo alcançado um teor de oligopeptídeos de 49,00%.

Palavras chave: soro de leite; hidrólise protéica; subtilisina; pancreatina; perfil peptídico; oligopeptídeos.

ABSTRACT

The protein enzymatic hydrolysates are widely used in patients with particular nutritional and physiological needs, since these preparations show several advantages in relation to free amino acid mixtures and intact proteins. The nutritional value of protein hydrolysates is associated with their di- and tripeptide contents and their quality is as higher as these contents increase. The aim of this work was to obtain whey protein hydrolysates rich in di- and tripeptides as well as in average size peptides (500Da) and with low contents of large peptides (>1000Da) and free amino acids, using a subtilisin and a pancreatin, separately. Process stages were optimized to reduce the cost for scaling up. The peptide profile analysis of these hydrolysates was performed by fractionation on size-exclusion-HPLC, followed by quantification of peptides and free amino acids by the Rapid Correct Fraction Area method. Using subtilisin, the best peptide profile was obtained with a substrate concentration of 15%, enzyme:substrate ratio (E:S) of 1:100 and 5h of reaction, with production of 41,42% of oligopeptides. For pancreatin, the substrate concentration of 10%, enzyme:substrate ratio (E:S) of 4:100 and reaction time of 10h gave the best result producing 49,00% of oligopeptides.

Key words: whey; protein hydrolysis; subtilisin; pancreatin; peptide profile; oligopeptides.

INTRODUÇÃO

Este trabalho faz parte da Linha de Pesquisa “Propriedades nutricionais e funcionais de proteínas alimentares”, criada em 1994 pela orientadora do presente trabalho, cuja meta final consiste na produção de suplementos dietéticos e alimentos para fins dietéticos especiais com diversas aplicações relevantes para as áreas de nutrição e saúde, como também a obtenção de ingredientes ou agentes funcionais para alimentos e medicamentos. O presente projeto representa a continuidade desta Linha, tendo como interesse primordial a obtenção de hidrolisados protéicos de soro de leite, ricos em oligopeptídeos.

O interesse do laboratório de Bromatologia/ Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG em hidrolisados protéicos está associado à preparação de suplementos dietéticos para diversas finalidades. Neste sentido, diferentes fontes protéicas, enzimas e condições hidrolíticas têm sido testadas a fim de se obter um perfil peptídico apropriado do ponto de vista nutricional, ou seja, com elevado teor de oligopeptídeos (MORATO *et al.*, 2000; CARREIRA *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2004; DE MARCO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; DELVIVO *et al.*, 2006, BIZZOTTO *et al.*, 2006).

As proteínas, como resultado da clivagem de suas ligações peptídicas, são transformadas em peptídeos de diferentes tamanhos e em aminoácidos livres. Essa hidrólise protéica pode ser realizada por enzimas, ácidos ou bases. A hidrólise química é um processo de difícil controle, que origina produtos com reduzida qualidade nutricional, devido à formação de D-aminoácidos e de substâncias tóxicas, como a lisinoalanina (LAHL e BRAUN, 1994; CLEMENTE, 2000). Esse método também pode destruir o triptofano, a lisina e a treonina e causar racemização da maioria dos aminoácidos (ADLER-NISSEN, 1981).

A hidrólise enzimática apresenta uma série de vantagens sobre a hidrólise química, como especificidade, controle do grau de hidrólise, condições moderadas de ação, disponibilidade comercial em larga escala, custo moderado, menor teor de sal no produto final e formação mínima de subprodutos (MANNHEIM e CHERYAN, 1992; PEARCE, 1995; CLEMENTE, 2000).

Além da melhoria das propriedades funcionais (solubilidade, poder emulsificante e textura) e organolépticas, é possível aumentar o aproveitamento nutricional das proteínas através do tratamento enzimático. Diversos autores têm demonstrado que

fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres, apresentando assim um maior valor nutritivo (KEOHANE *et al.*, 1985; GRIMBLE *et al.*, 1986; RÉRAT, 1993; BOZA *et al.*, 2000).

Nesse sentido, a introdução de hidrolisados protéicos ricos em oligopeptídeos na dieta pode ser importante, principalmente em determinadas situações como síndromes de má absorção intestinal, intolerância as proteínas do leite e em casos de deficiência enzimática, como por exemplo, fenilcetonúria (CHATAUD *et al.*, 1988; FREITAS *et al.*, 1993; GONZÁLES-TELLO *et al.*, 1994; BOZA *et al.*, 1995; CLEMENTE, 2000).

Para se obter hidrolisados com qualidade nutricional elevada e com propriedades desejáveis e agradáveis ao consumidor, é importante o controle das condições hidrolíticas, como pH, temperatura, enzima, tempo de hidrólise, tipo e concentração do substrato, relação enzima:substrato e inativação enzimática ao final do processo (SVENNING *et al.*, 1993; CÂNDIDO, 1998).

A avaliação dos teores de peptídeos em hidrolisados protéicos envolve, inicialmente, o fracionamento das amostras. Neste sentido, várias técnicas cromatográficas têm sido descritas na literatura, mas estas apresentam inúmeros inconvenientes, tais como interações entre o soluto e a fase estacionária e a ineficiência em separar os pequenos peptídeos (LEMIEUX *et al.*, 1991; SCHIMIDT & POLL, 1991; DAVIS & LEE, 1992; GOLOVCHENKO *et al.*, 1992; VISSER *et al.*, 1992).

SILVESTRE *et al.* (1994a) desenvolveram um método eficiente para fracionamento e quantificação dos peptídeos, empregando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli-(2-hidroxietil-aspartamido)-sílica (PHEA), que lhes possibilitou separar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000Da, sendo este método empregado no presente trabalho.

A caseína, a principal proteína do leite, tem sido a primeira escolha como fonte protéica no preparo de hidrolisados protéicos. Entretanto, em países subdesenvolvidos, esta proteína é importada, o que representa um importante aumento nos custos de produção. Portanto, o uso de fontes alternativas deve ser investigado. Por esta razão, neste trabalho o soro de leite foi selecionado como matéria prima. Além disso, suas proteínas possuem um elevado valor biológico, devido ao seu elevado conteúdo em aminoácidos livres (SGARBIERI, 2004).

E também, a utilização do soro pode contribuir para a redução da poluição ambiental, já que, a despeito das várias possibilidades de sua utilização, que têm sido descobertas nos últimos 50 anos, aproximadamente metade da produção mundial de

soro é descartada em efluentes sem qualquer tratamento (SISO, 1996; CHERYAN, 1998).

Este trabalho teve como objetivo estudar diferentes condições de hidrólise, a fim de se obter hidrolisados protéicos de soro de leite ricos em di- e tripeptídeos, e em peptídeos médios (500Da), além de conter baixo teor de grandes peptídeos (>1000Da) e de aminoácidos livres, empregando-se as enzimas subtilisina e pancreatina, isoladamente. Para isso, as etapas do processo foram otimizadas, visando, também, a adaptação em escala industrial. Os hidrolisados foram fracionados por HPLC de exclusão molecular e, para a quantificação dos peptídeos, empregou-se o método rápido da Área Corrigida da Fração.

REVISÃO DE LITERATURA

1 SORO DE LEITE – DADOS RELEVANTES

Soro é o líquido remanescente após a precipitação e remoção da caseína do leite, sendo que seus principais componentes são: a lactose (4,5%-5,0%), as proteínas solúveis (0,6%-0,8%), os lipídios (0,4%-0,5%) e os sais minerais (8,0%-10,0%) (SISO, 1996).

A composição do soro varia de acordo com o procedimento de separação da caseína obtendo-se dois tipos de soro: o soro ácido (pH < 5,0) e o soro doce (pH 6,0-7,0). O soro doce é obtido no processo de coagulação enzimática (enzima quimosina), enquanto o soro ácido resulta da precipitação ácida no pH isoelétrico (pH = 4,6) (SGARBIERI, 2004). O soro ácido geralmente contém maior teor de minerais e menor conteúdo de proteínas que o soro doce, sendo seu uso em alimentação mais limitado devido ao seu sabor ácido e ao elevado teor salino (SISO, 1996).

Para fazer 1kg de queijo, cerca de 9kg de soro são gerados, por isso, o soro é também definido como subproduto da fabricação de queijo, sendo considerado um resíduo de baixo ou nenhum valor comercial usado na alimentação de animais ou descartado em efluentes sem qualquer tratamento (SGARBIERI, 1996, SISO, 1996; WALZEN *et al.*, 2002). Devido ao seu elevado conteúdo em matéria orgânica, associado principalmente a presença de lactose e proteínas, o soro possui uma elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO). A DBO é a determinação da

quantidade de oxigênio dissolvida na água e utilizada pelos microorganismos na oxidação bioquímica da matéria orgânica. É o parâmetro mais empregado para medir a poluição, normalmente utilizando-se a demanda bioquímica de cinco dias (DBO₅). A DBO₅ do soro é de 3.0000 – 50. 000mg/L), isto significa que para cada litro de soro descartado nos efluentes, cerca de 30g a 50g de oxigênio dissolvido na água desaparecerão (REDE AMBIENTE, 2007). Além da poluição ambiental, o descarte do soro é também um desperdício de material protéico e outros nutrientes, uma vez que retém cerca de 55% dos nutrientes do leite. (SISO, 1996; ALMEIDA *et al.*, 2001).

Porém, esta visão vem mudando com a descoberta de propriedades funcionais e bioativas do soro e seus componentes, sendo este, agora, considerado como um co-produto da produção de queijo (WALZEN *et al.*, 2002).

No Brasil, a elaboração de bebidas lácteas é uma das principais opções de aproveitamento do soro de leite, e as mais comercializadas são as bebidas fermentadas, com características sensoriais semelhantes ao iogurte, e bebidas lácteas não fermentadas. Contudo, o aproveitamento desse subproduto atinge apenas 15% do total de soro produzido, com a produção nacional, em 2002, estimada em 470 mil toneladas (NEVES, 2001; CAPITANI *et al.*, 2005).

1.1 As proteínas do soro

O soro contém aproximadamente 20% das proteínas originais do leite. As duas principais proteínas são as β -lactoglobulinas e a α -lactalbumina, que perfazem de 70% a 80% das proteínas totais do soro (SGARBIERI,1996). As sub-frações ou peptídeos secundários, assim denominados por se apresentarem em pequenas concentrações no soro de leite, são compostas por: glicomacropéptido, imunoglobulinas, albumina, lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima, lactolina, relaxina, lactofano, fatores de crescimento IGF-1 e IGF-2, proteoses-peptonas e aminoácidos livres (HARAGUCHI *et al.*, 2006).

As quantidades de referência de aminoácidos essenciais foram revistas em 1990 pela FAO/WHO (Food and Agriculture Organization e World Health Organization) que estabeleceu dois padrões de necessidades: um para crianças com menos de 2 anos, que corresponde à composição do leite humano; e um outro padrão, para as idades seguintes, obtido com base na taxa de oxidação de aminoácidos em função dos níveis ingeridos. As proteínas do soro apresentam quase todos os aminoácidos essenciais em

excesso às recomendações nutricionais de consumo da FAO/WHO, exceto para os aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina), tanto para crianças como para adultos (SGARBIERI, 2004; TORRES, 2005).

Devido ao seu conteúdo em aminoácidos essenciais, o valor biológico das proteínas do soro é alto se comparado ao de outras proteínas, além disso, as proteínas do soro contêm uma alta concentração de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina). Segundo HA & ZEMEL (2003), a abundância de leucina no soro é de particular interesse, uma vez que este aminoácido tem sido identificado como iniciador da síntese protéica muscular. Em razão do seu relativo excesso em aminoácidos essenciais (lisina, treonina, metionina, isoleucina) as proteínas do soro são suplementos efetivos para proteínas vegetais que são deficientes nestes aminoácidos (WALZEN *et al.*, 2002; HA & ZEMEL, 2003).

As proteínas do soro contêm várias seqüências de aminoácidos com propriedades bioativas, ou seja, sua hidrólise pode liberar peptídeos capazes de modular respostas fisiológicas no organismo animal. Muitos já foram isolados e caracterizados, tendo sido observadas atividades imunomoduladora, antimicrobiana e antiviral, antitumoral, antiúlcera, antihipertensiva, anticoagulante, opióide, ergogênica, antiolesterolemica e fatores de crescimento celular (PIHLANTO-LAPPÄLLÄ, 2001; GAUTHIER & POULIOT, 2003; SGARBIERI, 2004; PACHECO *et al.*, 2005).

As proteínas do soro de leite são muito conhecidas pela versatilidade de suas propriedades funcionais, sendo utilizadas na fabricação de bebidas lácteas, na produção de ricota e como coadjuvante tecnológico e/ou ingrediente nas indústrias de produtos cárneos, panificação e confeitaria (WIT, 1998; USDEC, 2002).

Em relação aos aspectos nutricionais e fisiológicos, as proteínas do soro podem ser utilizadas em diversos suplementos, na forma nativa ou pré-digeridas, como por exemplo, na formulação de hidrolisados protéicos para pacientes com várias síndromes de má absorção intestinal e com intolerância as proteínas do leite (FREITAS *et al.*, 1993; BOZA *et al.*, 1995), para idosos, atletas e dietas de controle de peso (FROKJAER, 1994) e para pacientes fenilcetonúricos (KITAGAWA *et al.*, 1987; SHIMAMURA *et al.*, 1999; CLEMENTE, 2000). Com relação a esta última utilização do soro, em estudos recentes realizados no laboratório de Bromatologia/ Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG, no qual foi desenvolvido o presente trabalho, grande parte da fenilalanina foi removida de hidrolisados enzimáticos preparados com a pancreatina e a papaína, visando o desenvolvimento de suplementos dietéticos para fenilcetonúricos (DE MARCO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; DELVIVO *et al.*, 2006).

1.1.1 β -lactoglobulina

A β -lactoglobulina (β -Lg) é, quantitativamente, a principal proteína do soro de leite, apresentando peso molecular médio entre 18400 Da – 36800Da. É a principal proteína do soro de leite em ruminantes e porcos, não sendo encontrada em abundância no leite de muitas outras espécies. A β -lactoglobulina apresenta polimorfismo genético, sendo que as variantes A e B são mais comuns (KINSELLA & WHITEHEAD, 1989; SGARBIERI, 1996; HARAGUCHI, *et al.*, 2006).

A β -lactoglobulina tem na sua estrutura primária 162 aminoácidos, ponto isoelétrico de 5,2 e peso molecular de aproximadamente 18.300Da. Possui cinco resíduos de cisteína sendo que quatro estão envolvidos em duas ligações dissulfeto entre os resíduos de cisteína (106-119) e (66-160) que contribuem para a estrutura terciária da proteína (TORRES, 1995).

A alergenicidade atribuída às proteínas do leite está, essencialmente, associada à β -lactoglobulina, e afeta cerca de 1%-2% de crianças com menos de 2 anos, sendo algo compreensível já que se trata de uma proteína inexistente no leite humano (TORRES, 1995).

A proteína existe como um dímero estável em solução (leite) devido à interação eletrostática entre Asp¹³⁰ e Glu¹³⁴ de um monômero com o resíduo de lisina de outro monômero e em pH < 3 e pH > 8, os dímeros se dissociam em monômeros (KINSELLA & WHITEHEAD, 1989; SGARBIERI, 1996).

Embora isolada há 60 anos atrás, a função desta proteína, segundo WALZEN *et al.* (2002), ainda é desconhecida, mas ela se liga ao cálcio e zinco e a uma variedade de pequenas moléculas hidrofóbicas. Entretanto WIT (1998), em seu trabalho, atribui à β -lactoglobulina a propriedade de transportador de retinol (pró vitamina A). De acordo com o autor, a estrutura globular da β -Lg é extraordinariamente estável aos ácidos e enzimas proteolíticas do estômago, tornando-a um resistente carreador de retinol materno para o filhote. Porém, esta função biológica parece não ser importante para bebês humanos, uma vez que a β -Lg não está presente no leite humano (WIT, 1998).

1.1.2 α -lactalbumina

Em termos quantitativos, a α -lactalbumina (α -La) é a segunda proteína do soro (14000 Da) e está presente no leite de todos os mamíferos cuja lactose é o principal

açúcar. A proporção de α -La e β -Lg no leite bovino é de 1:3 (KINSELLA & WHITEHEAD, 1989; WALZEN *et al.*, 2002).

A α -lactalbumina (α -La) é uma proteína globular compacta e aparece como monômero no pH natural do leite (pH 6,6), possui um excelente perfil de aminoácidos essenciais, sendo rica em lisina, leucina, treonina, triptofano e cistina (KINSELLA & WHITEHEAD, 1989; SGARBIERI, 1996).

A função biológica da α -La é modular a especificidade da galactosiltransferase no complexo lactose sintetase, que catalisa o último passo da biossíntese da lactose no tecido mamário, pelo substrato (KINSELLA & WHITEHEAD, 1989; SGARBIERI, 1996; WALZEN *et al.*, 2002).

A α -La purificada é usada comercialmente em fórmulas infantis devido à similaridade estrutural e composicional em relação a principal proteína do leite materno. É também utilizada em alimentos protéicos para esportistas, pois constitui uma boa fonte de aminoácidos de cadeia ramificada, os quais estão envolvidos no fornecimento de energia e síntese protéica muscular (WALZEN *et al.*, 2002; HA & ZEMEL, 2003).

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS

2.1 Importância

A hidrólise de proteínas pode ser catalisada por ácidos, bases ou enzimas. A hidrólise ácida e alcalina são totalmente inespecíficas, podendo destruir aminoácidos como triptofano, lisina, treonina e causar a racemização da maioria dos aminoácidos, comprometendo o valor nutricional da proteína (ADLER-NISSEN, 1985).

A utilização de proteases específicas apresenta algumas vantagens sobre a hidrólise alcalina ou ácida, como a especificidade, o controle do grau de hidrólise, as condições moderadas de ação, o menor conteúdo de sal no hidrolisado final e, ainda, a formação mínima de subprodutos (MANNHEIM & CHERYAN, 1992; PEARCE, 1995).

Além disto, como as enzimas podem ser empregadas, geralmente, em concentrações muito baixas, sua remoção do sistema da reação é freqüentemente desnecessária e mais fácil do que para outros catalisadores, os quais devem ser usados em concentrações maiores (REED, 1975).

O processo de hidrólise enzimática tem se destacado na melhoria das propriedades funcionais das proteínas, como solubilidade, poder emulsificante, textura, tendo grande aplicabilidade em vários produtos alimentícios (ABERT & KNEIFEL, 1993; DUARTE *et al.*, 1998; SILVESTRE *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2003a,b,c; VIANA *et al.*, 2004, 2005; CAPOBIANGO *et al.*, 2006). As proteases têm sido utilizadas para a modificação de proteínas, como na hidrólise de soja e outros vegetais, para a solubilização de concentrados de peixes, amaciamento de carnes, hidrólise de caseína, na melhoria da textura de queijos, aumentando assim, significativamente, a qualidade e o valor nutritivo dos produtos (CHEFTEL *et al.*, 1989).

Além da melhoria das propriedades funcionais e organolépticas, é possível aumentar o aproveitamento nutricional das proteínas através do tratamento enzimático. Um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado para utilização dietética é sua distribuição quanto ao tamanho dos peptídeos, pois é sabido que o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção (GRIMBLE *et al.*, 1986; VIJAYALAKSHIMI *et al.*, 1986). Diversos autores têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente pelo organismo do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou a proteína intacta, apresentando assim um maior valor nutritivo (KEOHANE *et al.*, 1985, GRIMBLE *et al.*, 1986; RÉRAT, 1993; BOZA *et al.*, 2000).

As proteínas do soro do leite contêm várias seqüências de aminoácidos com propriedades bioativas, ou seja, sua hidrólise pode liberar peptídeos com atividades funcional e biológica. Muitos já foram isolados e caracterizados, tendo sido observadas atividades imunomoduladora, antimicrobiana e antiviral, antitumoral, antiúlcera, antihipertensiva, anticoagulante, opióide, ergogênica, anticolesterolemica e fatores de crescimento celular (PACHECO *et al.*, 2005; SGARBIERI, 2004; GAUTHIER & POULIOT, 2003; PIHLANTO-LAPPÄLLÄ, 2001).

Uma desvantagem encontrada no processo de hidrólise enzimática é o desenvolvimento de sabor amargo no decorrer da catálise, o qual parece estar relacionado à liberação de grupamentos hidrofóbicos que se encontravam no interior das moléculas protéicas. Esta característica representa um dos principais obstáculos na aplicação generalizada dos hidrolisados (MINAGAWA *et al.*, 1989; SAHA & HAYASHI, 2001).

Entretanto, alguns procedimentos podem ser utilizados para o mascaramento do sabor amargo de hidrolisados protéicos, tais como adição de compostos para mascarar sabor, aplicação de cromatografia hidrofóbica, adsorção de peptídeos amargos,

hidrólise com exopeptidases, adição de lactobacillus, formação de plasteína, tratamento com carvão ativado e extração com solventes orgânicos (SAHA & HAYASHI, 2001; MORAIS *et al.*, 2005).

A encapsulação em lipossomas e em lipoesferas foi utilizada no mesmo laboratório onde foi realizado o presente trabalho, tendo sido eficiente para mascarar o sabor amargo de hidrolisados enzimáticos de caseína, obtidos pela ação da papaína (BARBOSA *et al.*, 2004; MORAIS *et al.*, 2004, 2005).

Desta forma, fica evidente que o controle dos parâmetros hidrolíticos nas modificações enzimáticas das proteínas constitui uma etapa importante para se obter produtos com qualidade nutricional elevada, propriedades funcionais desejáveis e características organolépticas agradáveis ao consumidor.

2.2 Fatores interferentes

A qualidade e as características finais do hidrolisado protéico dependem de vários fatores que devem ser controlados para se alcançar os resultados desejados, entre eles encontram-se a natureza e associação de enzimas, pH, temperatura, tempo de hidrólise, tipo e concentração de substrato, relação enzima / substrato, inativação enzimática ao final do processo (ADLER NISSEN, 1981; CHOBERT *et al.*, 1988a,b; SILVESTRE *et al.*, 1994a,b CÂNDIDO, 1998).

2.2.1 Natureza da enzima

A escolha da enzima proteolítica é muito importante, uma vez que sua ação específica irá influenciar a composição final dos produtos de hidrólise, principalmente com relação ao tamanho médio dos peptídeos (GAUTHIER *et al.*, 1986; CHATAUD *et al.*, 1988; HAQUE e MOZAFFAR, 1992).

Segundo DEESLIE & CHERYAN (1981), a hidrólise enzimática é uma alternativa atrativa para a modificação das proteínas devido a possibilidade de trabalhar em sistemas contínuos, e a relativa especificidade das enzimas, que pode ser utilizada para aumentar o controle da funcionalidade do produto final. Estes autores verificaram que a seleção da enzima é essencial para o sucesso da operação do reator de ultrafiltração, uma vez que o substrato não hidrolisado pode acumular no sistema e

causar problemas como inibição da reação e polarização, entupimento e/ou aumento da pressão da membrana.

SCHMID & POOL (1991) testaram a ação de 14 enzimas na hidrólise da α -La e β -Lg e concluíram que a ação de uma dada enzima sobre estas proteínas pode ser bem diferente dependendo da composição do meio (presença de Ca^{2+}), temperatura de incubação e grau de desnaturação da proteína. Assim a α -La foi extensamente hidrolisada pela tripsina, papaína, bromelina e elastase, e de forma incompleta pela tripsina e pancreatina na presença de Ca^{2+} , colagenase, termolisina e dispase. Já a β -Lg foi significativamente hidrolisada somente pela pancreatina sem Ca^{2+} e parcialmente pela tripsina sem Ca^{2+} , pepsina, quimosina, colagenase e dispase.

Ao promover a hidrólise das proteínas do soro do leite, empregando uma protease do *Aspergillus niger* e a tripsina, PINTADO *et al.* (1999) observaram diferenças significativas, entre as duas enzimas, em termos de performance catalítica, ao analisar a concentração total de aminoácidos livres dos hidrolisados

Por outro lado, PEREA *et al.* (1993) verificaram que tanto a α -La quanto a β -Lg foram hidrolisadas de forma similar, em relação a média molecular de peptídeos formados, por diferentes enzimas (alcalase, tripsina (pancreatina), mistura de enzimas proteolíticas). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por GONZÁLEZ-TELLO *et al.* (1994) que, utilizando a alcalase 6L para hidrolisar a α -La, não encontraram variação na distribuição dos peptídeos das frações cromatográficas, e por CHOBERT *et al.* (1988a) que, empregando duas enzimas diferentes (tripsina e protease V8 (*S. aureus*)), na hidrólise da caseína, não observaram variações no tamanho dos peptídeos obtidos nos dois processos.

A hidrólise da albumina sérica bovina pela subtilisina levou a uma predominância de di- e tripeptídeos, sem uma concomitante produção de aminoácidos livres. Por outro lado, empregando-se uma protease ácida do *Rhizopus sp*, ocorreu uma menor proporção de di- e tripeptídeos e um marcante aumento na proporção de grandes peptídeos e aminoácidos livres (VERNEUIL *et al.*, 1990).

O grau de amargor de hidrolisados também pode estar relacionado com o tipo de enzima. Assim, COGAN *et al.* (1981), observaram que hidrolisados de caseína obtidos com papaína ou pepsina apresentaram um grau de amargor maior, se comparados com outros originados pela ação de enzimas do tipo rozima.

GALLAGHER *et al.* (1994) verificaram que a ação individual de duas proteases produz hidrolisados com diferentes composições de peptídeos. Assim, a hidrólise da caseína resultou na produção de uma grande variedade de peptídeos hidrofóbicos,

normalmente associados ao sabor amargo, de baixo peso molecular (<1000Da), empregando-se a subtilisina, e com elevado peso molecular (>1000Da), utilizando-se a bromelina.

Empregando-se as mesmas condições hidrolíticas, o hidrolisado preparado com pancreatina apresentou maior conteúdo de peptídeos nas frações cromatográficas do que aquele preparado com tripsina, exceto a fração de grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos) (SILVESTRE *et al.*, 1994 b). Esta diferença no grau de hidrólise e na composição dos hidrolisados foi atribuída à mistura de enzimas presentes na pancreatina utilizada.

Uma extensiva hidrólise da caseína pela pancreatina foi demonstrada pelo perfil do peso molecular dos hidrolisados finais. Estes eram compostos principalmente por pequenos peptídeos, com pesos moleculares menores que 500Da, perfazendo 95% dos hidrolisados, não sendo observado nenhum hidrolisado com peso molecular maior que 2000 Da (MAHMOUD, *et al.*, 1992).

2.2.2 Tratamento térmico do substrato

A influência da temperatura na hidrólise enzimática pode ser observada em 3 etapas distintas, a saber: no pré-tratamento do substrato, durante a reação hidrolítica e na interrupção desta reação.

O pré-tratamento do substrato pelo calor, pode influenciar no grau de hidrólise, devido à desnaturação protéica. Este procedimento provoca uma modificação da estrutura tridimensional da proteína, agindo sobre suas ligações fracas, as quais são responsáveis pela conformação nativa, aumentando a exposição das ligações peptídicas (estrutura primária) melhorando, assim, a acessibilidade do substrato às enzimas (KATO *et al.*, 1985; SCHMIDT e MARKWIJK, 1993).

Entretanto, é interessante ressaltar que o tratamento térmico dos substratos nem sempre apresenta efeitos benéficos sobre as reações enzimáticas. SCHMID & MARKWIJK estudaram a influência da desnaturação pelo calor na velocidade de hidrólise das proteínas do leite (α -La e β -Lg), através do pré-aquecimento da solução por 8 min a 82°C. Estes autores verificaram que este tratamento não promoveu nenhuma influência significativa no tempo de proteólise da α -La e da β -Lg tratadas com pepsina porém, utilizando-se a papaína, a β -Lg foi mais rapidamente hidrolisada.

Empregando-se a enzima pronase na hidrólise da β -Lg e a pancreatina na hidrólise da α -La, SCHMIDT & POOL observaram que o desnaturamento protéico através do pré-aquecimento da solução a 95°C por 10 min tornou a proteína altamente susceptível a ação da enzima no primeiro caso, porém, a susceptibilidade foi fortemente diminuída no segundo.

A desnaturação protéica provocada pelo calor poderá, por sua vez, influenciar o pH ótimo de algumas enzimas. A pepsina, por exemplo, apresenta atividade máxima a pH 2 ao atuar sobre a hemoglobina. Após o substrato protéico ter sido desnaturado por tratamento térmico, este valor passa para 3,5 (WHITAKER, 1994).

Com relação ao efeito da temperatura durante a reação enzimática, sabe-se que cada enzima apresenta o seu valor ótimo de atuação, o qual é interpretado pela avaliação da curva de atividade *versus* temperatura, sendo dependente da duração da reação. Assim, ocorre uma grande variação entre as enzimas no que se refere às características de resistência ao calor uma vez que sua estabilidade térmica está inversamente relacionada com a duração de uma reação hidrolítica. Deste modo, as reações de período curto podem ser realizadas a temperaturas mais elevadas do que às aquelas mais longas (REED, 1975).

Segundo KILARA (1985), o tempo requerido para atingir um determinado grau de hidrólise diminui exponencialmente com o crescente aumento da temperatura da reação, até o momento em que a inativação enzimática pelo calor se torna significativa.

Como as enzimas são termolábeis, o calor de desnaturação resulta em uma perda gradual de suas propriedades catalíticas, sendo crescente a taxa de inativação com o aumento da temperatura. Deste modo, se por um lado as temperaturas mais elevadas aumentam o rendimento das reações enzimáticas, por outro, podem provocar a inativação da enzima, dependendo do calor aplicado (REED, 1975).

Esta ação do calor sobre a atividade enzimática tem sido utilizada por alguns autores, visando a interrupção da reação hidrolítica, empregando-se temperaturas na faixa de 80°C a 90°C, por 10 a 20 min. (LOOSEN *et al.*, 1991; SCHMIDT e MARKWIJK, 1981; SCHMID & POOL, 1991; SILVA *et al.*, 2005). De fato, valores mais elevados do que estes devem ser evitados, para que não ocorra alterações na composição dos hidrolisados protéicos (CHEFTEL *et al.*, 1989).

2.2.3 Relação enzima: substrato

A relação enzima substrato (E:S) exerce influência na velocidade da reação e no tamanho dos peptídeos produzidos no final do processo de hidrólise (GAUTHIER *et al.*, 1986).

Assim, SCHMID & POOL (1991), utilizando diferentes enzimas, verificaram que a redução da relação E:S de 1:100 para 1:1000, aumentou ou diminuiu a velocidade de hidrólise da α -La e/ou da β -Lg dependendo da enzima utilizada.

PINTADO *et al.* (1999), empregando duas enzimas, protease 2A (*A.niger*) e tripsina, ao testarem o efeito da relação E:S (2:100 e 4:100) na hidrólise do soro de leite, verificaram que o maior teor de todos os aminoácidos, exceto Asp, Gly e Ala, foi obtido utilizando-se uma protease do *Aspergillus niger* numa relação E:S de 4:100.

Comparando dois hidrolisados pancreáticos de caseína, SILVESTRE *et al.* (1994b) mostraram que uma redução na relação E:S de 1:25 para 1:200 levou à um maior conteúdo de grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos), e a uma menor proporção de peptídeos médios (4 a 7 resíduos de aminoácidos) e aminoácidos livres. Por outro lado, o teor de di- e tripeptídeos permaneceu inalterado.

2.3 Proteases

Enzimas proteolíticas ou proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas. São enzimas da classe 3, as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. Estas enzimas constituem uma grande família, dividida em endopeptidases ou proteinases e exopeptidases, de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica (RAO *et al.*, 1998; CLEMENTE, 2000).

Uma vez que são fisiologicamente necessárias para organismos vivos, as proteases são ubíquas, sendo encontradas numa ampla diversidade de fontes como plantas, animais e microrganismos (RAO *et al.*, 1998).

As exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas. Com base em seu sítio de ação, região N ou C terminal, são classificadas como amino ou carboxipeptidases, respectivamente. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal sendo que a presença de grupos amino ou carboxila livres tem um efeito negativo na atividade da enzima. Estas enzimas são divididas em quatro subgrupos de acordo com seu

mecanismo catalítico: serina proteases, aspártico proteases, cisteína proteases, e metaloproteases (RAO *et al.*, 1998).

Algumas proteases são produzidas por microorganismos, os quais são comuns entre os gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Aspergillus*, *Streptomyces* e *Rhizopus* (DINIZ & MARTIN, 1999).

A hidrólise seletiva de algumas ligações peptídicas é uma ferramenta importante para a obtenção de oligo e polipeptídeos (SBARBIERI, 1996). Aproximadamente 60% do total das enzimas industriais são proteases, amplamente empregadas na produção de couro e na indústria de alimentos. Nesta última, as proteases são utilizadas como adjuvantes no processamento de cerveja, vinho, cereais, leite, produtos lácteos, chocolate, ovos, produtos a base de ovos, produtos a base de carne e de peixe, legumes e na produção de proteína hidrolisada e flavorizantes (FURLAN & OETTERER, 2002).

2.3.1 Subtilisinas

As subtilisinas, originárias de várias espécies do gênero *Bacillus spp*, representam a segunda maior família de serino-proteases, atuando numa faixa de pH alcalino (*Bacillus licheniformes*, *amyloolyquefaciens*, *firmus*, *megaterium*, e *pumilis*) ou neutro (*Bacillus subtilis*, *cereus*, *megaterium*), com ponto isoelétrico de aproximadamente 9,4 (OTTESEN e SVENDSEN, 1970; REED, 1975; SAGARBIERI, 1996; RAO *et al.*, 1998).

As subtilisinas apresentam também preferência por ésteres de aminoácidos aromáticos, e em menor extensão por ésteres da lisina e arginina. A ação da subtilisina parece ocorrer, principalmente nas ligações peptídicas envolvendo os grupos amino e carboxila de resíduos neutros e ácidos (BEYNON e BOND, 1989; PEREA *et al.*, 1993).

O sítio ativo das subtilisinas se assemelha ao das serino-proteases de mamíferos, apresentando um resíduo de serina (221), de histidina (64) e de ácido aspártico (32), como também, o mesmo mecanismo enzimático. Por outro lado, estas classes de enzimas não apresentam qualquer semelhança na seqüência de aminoácidos na região próxima ao sítio ativo, bem como na estrutura tridimensional (BEYNON & BOND, 1989). Outra característica dessa enzima refere-se à completa ausência de cisteína ou cistina, em contraste com o elevado conteúdo de ligações

dissulfídicas nas várias proteases pancreáticas (OTTESEN e SVENDSEN, 1970; MARKLAND & SMITH, 1971).

O emprego da eletroforese mostrou que as subtilisinas apresentam uma maior estabilidade em pH ácido (5,3 a 6,5) do que em pH alcalino (8,1 a 9,5) onde ocorre a sua autólise. Apesar disso, sua estabilidade na região alcalina é superior à tripsina ou à quimotripsina. Estas proteases mantêm-se inalteradas por vários meses na forma liofilizada, em soluções dializadas mantidas a -10°C e em solução de glicerol. Em valores de $\text{pH} < 5$, entretanto, as proteases perdem rapidamente sua atividade, sendo irreversivelmente desnaturadas (MARKLAND e SMITH, 1971). Segundo PERLMANN e LORAND (1970), a instabilidade ácida pode ser devido à protonação de resíduos de histidina das porções hidrofóbicas situadas no interior da estrutura tridimensional.

2.3.2 Pancreatina

A pancreatina é um complexo enzimático constituído por enzimas secretadas pelo pâncreas que possuem atividades proteolíticas, amilolíticas e lipolíticas (PARK, 2001). As proteases pancreáticas são divididas em endopeptidases (tripsina, quimotripsina e elastase) e exopeptidases (carboxipeptidases A e B) (HINSBERGER e SANDHU, 2004).

A tripsina catalisa apenas a hidrólise das ligações peptídicas em que o grupo carbonila ($-\text{CO}-$) é fornecido pela arginina ou lisina, já a elastase cliva ligações entre resíduos de aminoácidos alifáticos (SBARBIERI, 1996; HINSBERGER e SANDHU, 2004).

A quimotripsina catalisa, principalmente, a hidrólise das ligações peptídicas adjacentes ao grupo carboxila dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, podendo também ocorrer com os aminoácidos hidrofóbicos leucina e metionina. Esta enzima tem peso molecular de 25.000 e contém 241 resíduos de aminoácidos, dentre estes, os resíduos de Asp-120, His-97 e Ser-195 participam na reação catalítica. A atividade ótima da quimotripsina situa-se na faixa de pH entre 7 e 9. Apresenta-se estável em pH ácido e perde sua atividade a pH superior a 9, quando o grupo NH_3^+ é convertido a NH_2 (HESS, 1971; YAMAMOTO, 1975).

A carboxipeptidase A é uma enzima proteolítica contendo zinco, que hidrolisa a ligação peptídica de resíduos carboxi-terminais com cadeias laterais aromáticas (fenilalanina, tirosina e triptofano) e alifáticas longas, desde que o carboxilato

C-terminal esteja livre. O zinco é ligado a dois anéis imidazóis da histidina e o grupo carboxil do glutamato está próximo do sítio ativo, o que proporciona estabilidade à atividade catalítica. A carboxipeptidase A tem peso molecular de 34.000 Da e seu pH ótimo está na faixa de 7 a 8 (HARTSUCK e LIPSCOMB, 1971; VÉRTESI *et al.*, 1999; PEDROCHE *et al.*, 2002). A carboxipeptidase B também contém zinco em sua estrutura e seu mecanismo de ação é similar a carboxipeptidase A, no entanto, o que difere uma da outra é quanto à especificidade ao substrato. A carboxipeptidase B requer que o resíduo C-terminal seja arginina ou lisina (WHITAKER, 1994; HINSBERGER e SANDHU, 2004).

Em função de sua especificidade, associada à presença da quimotripsina e da carboxipeptidase A, a pancreatina é usada como enzima proteolítica para produzir hidrolisados protéicos com teor reduzido de fenilalanina (OUTINEN *et al.*, 1996). Esta aplicação foi objeto de recentes estudos, realizados no mesmo laboratório do presente trabalho (SILVA *et al.*, 2005; BIZZOTTO *et al.*, 2006; DELVIVO *et al.*, 2006).

3 IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL OS HIDROLISADOS PROTÉICOS

Desde 1940, os hidrolisados protéicos vêm sendo utilizados com finalidades terapêuticas para a manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir proteínas. Entretanto, na década de setenta esta utilização manifestou expressivo crescimento, que continua ao longo dos últimos anos, tanto por seus aspectos nutricionais e clínicos, como pela melhoria das propriedades funcionais das proteínas (CÂNDIDO, 1998).

Hidrolisados protéicos são produtos destinados, primeiramente, para uso nutricional de indivíduos que apresentam necessidades nutricionais e/ ou fisiológicas não cobertas pela alimentação convencional (MIRA & MARQUEZ, 2000; CLEMENTE, 2000).

O valor nutricional irá depender, essencialmente, de 3 fatores: da proteína de origem, do modo de hidrólise e do tamanho dos peptídeos formados na hidrólise. Assim a qualidade de uma proteína alimentar é função da natureza e da sua composição em aminoácidos, especialmente os essenciais (ANANTHARAMAN & FINOT, 1993).

Misturas de aminoácidos livres podem ser usadas para substituir alimentos protéicos em dietas especiais. Entretanto, estas preparações apresentam, pelo menos,

três limitações à sua utilização, a saber: 1. o gosto e o odor desagradáveis característicos de aminoácidos livres; 2. a alta osmolaridade, o que acarreta um aumento da pressão osmótica intestinal causando diarreia; 3. absorção reduzida, uma vez que os aminoácidos livres não são tão rápida e completamente absorvidos pelo organismo quanto os hidrolisados protéicos (SHIMAMURA, 1999).

Vários trabalhos comparam a absorção entre os aminoácidos originados de hidrólise enzimática de proteínas com uma mistura equivalente de aminoácidos livres. A velocidade de absorção intestinal de aminoácidos é consideravelmente maior para soluções contendo somente di- e tripeptídeos ou proteína parcialmente hidrolisada, do que aquelas constituídas apenas de aminoácidos livres (KEOHANE *et al.*, 1985; GRIMBLE *et al.*, 1986; RÉRAT, 1993; BOZA *et al.*, 2000).

Estudos do mecanismo de absorção intestinal verificaram que a velocidade de absorção de aminoácidos livres é menor que aquela dos pequenos peptídeos devido a alguns fatores como: 1 competição entre aminoácidos com moléculas estruturalmente relacionadas pelo mesmo carreador. Assim, a absorção de alguns aminoácidos pode ser inibida por outros, como, por exemplo, o triptofano inibe a absorção de histidina e a leucina diminui a absorção de isoleucina, fenilalanina e triptofano; 2 o transporte de aminoácidos é facilmente saturável, pois, depende de carreadores que são específicos para aminoácidos neutros, básicos e ácidos; 3 enquanto os aminoácidos livres parecem ser mais rapidamente absorvidos apenas no delgado proximal, os di- e tripeptídeos o são tanto na porção proximal, quanto distal do delgado (GRIMBLE & SILK, 1989; FRENHANI & BURINI, 1999; HINSBERGER & SANDHU, 2004).

A dietoterapia é uma importante área que faz uso dos hidrolisados protéicos para complementar ou suplementar dietas de indivíduos que são incapazes de ingerir quantidades adequadas de alimentos de forma convencional, ou prover nutrição especial para pacientes com necessidades fisiológicas e nutricionais particulares (CLEMENTE, 2000). Neste sentido, os hidrolisados protéicos têm sido utilizados, especialmente nos países desenvolvidos, na fabricação de alimentos especiais para diversos grupos, tais como os recém-nascidos prematuros, as crianças com diarreia, gastroenterite, má-absorção, fenilcetonúria e, ainda, para pessoas com alergia a proteínas, visto que o decréscimo no tamanho dos peptídeos possui relação direta com a diminuição da imunogenicidade (FREITAS *et al.*, 1993, GONZÁLEZ-TELLO *et al.*, 1994; BOZA *et al.*, 1995). Além disso, estes preparados enzimáticos podem ser úteis na suplementação dietética de idosos, na nutrição de esportistas, como também, em dietas para controle de peso (FRØKJAER, 1994).

As misturas de peptídeos são indispensáveis como matérias-primas de pães, doces, produtos alimentícios fortificados, produtos alimentícios para crianças, alimentos em geral para a saúde, nutrientes para dieta enteral, suplementos para atletas, entre outros (SHIMAMURA *et al.*, 1999).

Além disso, o valor nutricional dos hidrolisados protéicos depende da presença, em quantidade significativa, de determinados aminoácidos na forma de pequenos peptídeos, uma vez quando livres apresentam problemas com relação à estabilidade e à solubilidade. Assim, a tirosina e a cistina são pouco solúveis, a glutamina e a cisteína são instáveis em solução e facilmente destruídas durante as etapas de esterilização e armazenamento. Entretanto, sob a forma de di- e tripeptídeos, estes aminoácidos apresentam boa solubilidade e estabilidade, o que mostra a importância do isolamento destes peptídeos de hidrolisados protéicos (FURST *et al.*, 1990; ANANTHARAMAM & FINOT, 1993). Por este motivo, a caracterização nutricional destas preparações deve, também, envolver o doseamento destes aminoácidos nas diferentes frações peptídicas (SILVESTRE *et al.*, 1994a, MORATO *et al.*, 2000).

A utilização de hidrolisados protéicos, além de ser vantajosa do ponto de vista nutricional, é consideravelmente menos onerosa que uma mistura de aminoácidos sintéticos (COGAN *et al.* 1981, AUBES-DUFAU *et al.*, 1995).

4 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS

Vários métodos têm sido relatados na literatura visando o fracionamento de hidrolisados protéicos. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), especialmente a de fase reversa (RP-HPLC), mostrou-se eficiente em vários estudos para separar peptídeos de um hidrolisado protéico, além de fornecer algumas informações sobre as suas hidrofobicidades ou hidrofilicidades (LEMIEUX, *et al.*, 1991). A cromatografia de troca iônica é outro método que, também, tem sido utilizado para analisar os hidrolisados protéicos (DIZDAROGLU, 1985).

A cromatografia de exclusão molecular (SEC) ou cromatografia em gel, especialmente a líquida de alta eficiência (SE-HPLC) representa uma escolha muito interessante dentre as técnicas cromatográficas. Vários materiais têm sido elaborados como suporte para separar os peptídeos por tamanho. Muitos géis são estudados para

saber qual é o melhor para determinado aminoácido ou peptídeo. Por exemplo, os géis Sephadex G-25 (AMIOT & BRISSON, 1980; ZHANG, *et al.*, 1992), Sephadex G-10 (LANDRY *et al.*, 1988) e o Bio-gel P-2 (ILIEV & TCHORBANOV, 1992) são utilizados por vários autores para determinar o triptofano.

A cromatografia de troca de ligante, que envolve a formação de complexos entre íons metálicos, é outro método para separar peptídeos e aminoácidos de hidrolisados protéicos. Vários autores têm usado a cromatografia líquida de alta eficiência de troca ligante (LE-HPLC) para separar peptídeos de hidrolisados protéicos.

LEMIEUX & AMIOT (1990), ao comparar a utilidade de cinco tipos de cromatografias, para separar um hidrolisado protéico de caseína comercial, concluíram que o melhor sistema para a distribuição do peso molecular foi o SE-HPLC. A combinação de SE-HPLC e AE-HPLC mostrou grande sucesso na separação de peptídeos fosforilados e desfosforilados no hidrolisado de caseína, além da identificação de mais de 200 destes compostos (LEMIEUX & AMIOT, 1990).

O fracionamento de oligopeptídeos apresenta problemas, ainda mais complexos, pois envolve a interação com o suporte cromatográfico. SILVESTRE *et al.* (1994a) desenvolveram um método eficiente para este fim, empregando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli (2-hidroxietil-aspartamido)-sílica (PHEA), que lhes possibilitou separar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000Daltons.

Devido a sua simplicidade e rapidez, a eletroforese em gel de poliacrilamida-sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE) sulfato foi utilizada por SCHIMIDT & POLL (1991) para estimar a distribuição por pesos moleculares de peptídeos. Entretanto, esta técnica não permite a identificação dos oligopeptídeos que são arrastados no momento da coloração e lavagem do gel.

A Espectrofotometria Derivada Segunda (EDS) foi empregada por SILVESTRE *et al.* (1994b) para analisar hidrolisados de caseína. Com este método, os autores estimaram o grau de hidrólise e a homogeneidade do hidrolisado (presença de hidrolisado protéico ou mistura de aminoácidos). Essa técnica já foi empregada, no mesmo laboratório onde foi realizado o presente trabalho, para a avaliação do grau de encapsulação de hidrolisados enzimáticos de caseína (BARBOSA *et al.*, 2004; MORAIS *et al.*, 2004; 2005), como também para a determinação de aminoácidos aromáticos de hidrolisados enzimáticos de soro de leite (SILVA *et al.*, 2005; DE MARCO *et al.*, 2005 *et al.*, DELVIVO 2006)

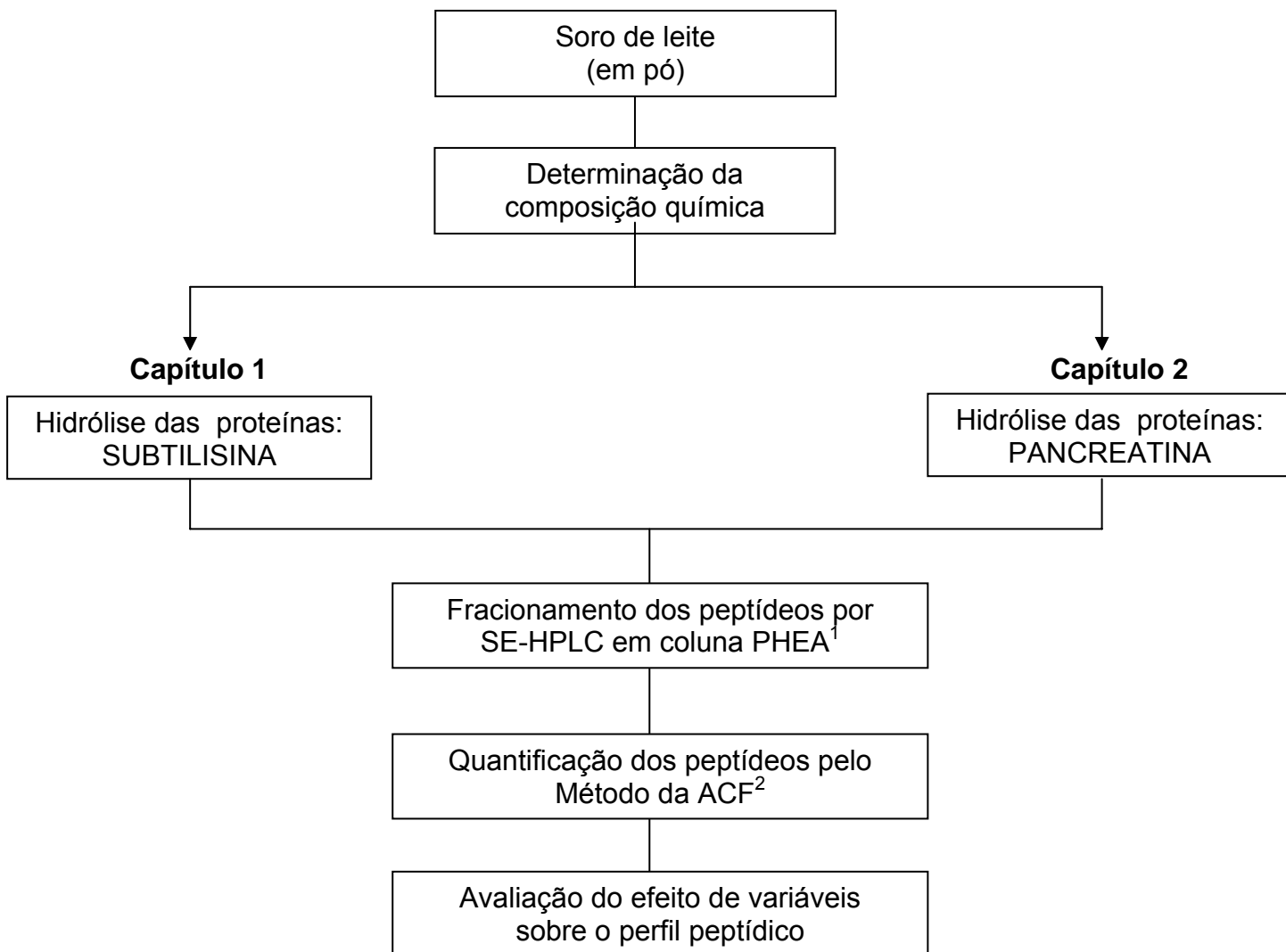
TRABALHO EXPERIMENTAL

APRESENTAÇÃO

A parte experimental deste trabalho está apresentada na forma de fluxograma, na Figura 1. Os resultados foram divididos em dois capítulos e redigidos sob a forma de artigos científicos.

O primeiro capítulo refere-se à utilização da subtilisina na obtenção de hidrolisados de soro de leite ricos em di- e tripeptídeos e peptídeos com massa molecular média (500Da), bem como com baixos teores de grandes peptídeos e aminoácidos livres. Algumas variáveis como a concentração do substrato, a relação enzima substrato e o tempo de reação foram testadas. Para isso, os dezoito hidrolisados obtidos foram fracionados, utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular e, para a quantificação dos componentes das frações cromatográficas, empregou-se o método rápido da área corrigida da fração.

No capítulo 2, a pancreatina foi utilizada para o preparo de hidrolisados de soro de leite com elevados teores de di- e tripeptídeos e peptídeos com massa molecular média (500Da), bem como com baixos conteúdos de grandes peptídeos e aminoácidos livres. As variáveis como concentração do substrato, relação enzima substrato e tempo de reação foram, igualmente, testadas, obtendo-se dezoito hidrolisados. Em seguida, os hidrolisados foram fracionados e quantificados pelos mesmos procedimentos citados acima.



¹SE-HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SILVESTRE *et al.*, 1994a).

²ACF: método rápido da área corrigida da fração (SILVESTRE *et al.*, 1994b).

Figura 1 - Principais etapas do trabalho experimental

CAPITULO I

UTILIZAÇÃO DA SUBTILISINA NA HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE PARA OBTER ELEVADO TEOR DE OLIGOPEPTÍDEOS

RESUMO

Tendo como objetivos a elevação do teor de oligopeptídeos e a redução de custos para produção em larga escala, diferentes condições hidrolíticas foram empregadas na obtenção de hidrolisados enzimáticos de soro de leite. Foram testados o tempo de hidrólise (5h, 10h e 15h), a relação enzima:substrato (E:S) (1:100, 2:100 e 4:100) e a concentração do substrato (10% e 15%). Os hidrolisados foram fracionados por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) e, para a quantificação dos componentes das frações cromatográficas, empregou-se o método rápido da Área Corrigida da Fração. Para os parâmetros estudados, observaram-se efeitos variados da subtilisina sobre o perfil peptídico dos hidrolisados, sendo que teores de oligopeptídeos superiores a 40% foram encontrados para os hidrolisados S10 (substrato a 15%; E:S = 1:100; tempo = 5h) e S17 (substrato a 15%; E:S = 2:100; tempo = 15h). Porém, no preparo do hidrolisado S10 foi empregada maior concentração de substrato e menores relação E:S e tempo de reação, condições estas mais adequadas para serem testadas em escala industrial.

Palavras chave: hidrolisados protéicos, subtilisina, soro de leite, oligopeptídeos, perfil peptídico.

ABSTRACT

USE OF SUBTILISIN FOR HYDROLYSING WHEY PROTEINS AND OBTAINING HIGH OLIGOPEPTIDE CONTENTS. With the aim of increasing the oligopeptide contents and reducing the costs for the scale up, different hydrolytic conditions were used for obtaining whey enzymatic hydrolysates. The hydrolysis time (5h, 10h and 15h), the enzyme:substrate ratio (E:S) (1:100, 2:100 and 4:100) and the substrate concentration (10% and 15%) were tested. The hydrolysates were fractionated by size-exclusion-HPLC and the rapid Correct Fraction Area method was used for quantifying the peptides. Varied effects on the peptide profiles were observed for the different parameters and oligopeptide contents above 40% were found for the hydrolysates S10 (substrate = 15%; E:S = 1:100; reaction time= 5h) and S17 (substrate = 15%; E:S = 2:100; reaction time = 15h). However, S10 was more advantageous than S17, since its preparation involved more appropriate conditions to be tested in large scale production, *i.e.*, higher substrate concentration and lower E:S ratio and reaction time.

Key words: protein hydrolysate, subtilisin, whey, oligopeptides, peptide profile.

INTRODUÇÃO

O soro de leite é o líquido remanescente após a precipitação e remoção da caseína do leite. Contém, aproximadamente, 20% das proteínas originais do leite. As duas principais proteínas são as β -lactoglobulinas e a α -lactalbumina, que perfazem de 70 a 80% das proteínas totais do soro (SGARBIERI, 1996).

As proteínas do soro contêm várias seqüências de aminoácidos com propriedades bioativas, ou seja, sua hidrólise pode liberar peptídeos com atividades funcional e biológica. Muitos já foram isolados e caracterizados, tendo sido observadas atividades imunomoduladora, antimicrobiana e antiviral, antitumoral, antiúlcera, antihipertensiva, anticoagulante, opióide, ergogênica, anticolesterolemica e fatores de crescimento celular (PACHECO *et al.*, 2005; SGARBIERI, 2004; GAUTHIER & POULIOT, 2003; PIHLANTO-LAPPÄLLÄ, 2001).

Diversas aplicações industriais para o soro do leite já estão bem definidas, a mais usada é na indústria de laticínios, como, por exemplo, na produção de ricota e inúmeras bebidas lácteas. Além disso, é extensamente utilizado como coadjuvante tecnológico e/ ou ingrediente na indústria de produtos cárneos, panificação e confeitaria (USDEC, 2002).

Por outro lado, a despeito de todas as possíveis aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica, no Brasil o soro ainda é considerado como um rejeito de baixo ou nenhum valor comercial, subproduto da fabricação de queijo, sendo utilizado na alimentação de animais ou descartado em efluentes sem qualquer tratamento. Devido a sua alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), associada, principalmente, à presença de lactose e proteínas, constitui-se num forte agente de poluição ambiental (SISO, 1996; CHERYAN, 1998). Por esta razão, é de grande interesse criar opções para utilização do soro do leite e o presente trabalho representa mais uma contribuição neste sentido.

A hidrólise de proteínas pode ser catalisada por ácidos, bases ou enzimas. O tratamento enzimático, utilizando-se proteases específicas, apresenta algumas vantagens sobre a hidrólise química, como a especificidade, o controle do grau de hidrólise, o emprego de condições moderadas de ação, o menor conteúdo de sal no hidrolisado final e, ainda, a formação mínima de subprodutos (MANNHEIM & CHERYAN, 1992; PEARCE, 1995). Além disso, o tratamento enzimático contribui para a melhoria das propriedades funcionais, organolépticas e nutricionais das proteínas.

Um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado para utilização dietética consiste na distribuição de peptídeos quanto ao tamanho da cadeia, pois sabe-se o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção (VIJAYALAKSHIMI *et al.*, 1986). Diversos autores têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou a proteína intacta, apresentando assim um maior valor nutritivo (KEOHANE *et al.*, 1985; GRIMBLE *et al.*, 1986; RÉRAT, 1993; BOZA *et al.*, 2000). Portanto, é necessária a quantificação dos teores de peptídeos dos hidrolisados a fim de avaliar a qualidade nutricional do hidrolisado.

Neste sentido, várias técnicas cromatográficas têm sido descritas na literatura, mas apresentam inúmeros inconvenientes, tais como interações secundárias entre o soluto e a fase estacionária e a ineficiência em separar os pequenos peptídeos (LEMIEUX *et al.*, 1991; SCHIMIDT & POLL, 1991; DAVIS & LEE, 1992; GOLOVCHENKO *et al.*, 1992; VISSER *et al.*, 1992).

SILVESTRE *et al.* (1994a) desenvolveram um método para fracionamento e quantificação dos peptídeos, empregando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli (2-hidroxi-etil-aspartamida)-sílica (PHEA), que lhes possibilitou separar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000Da, sendo este método empregado neste trabalho.

O efeito da hidrólise enzimática sobre o perfil peptídico de hidrolisados protéicos vem sendo estudado no laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da UFMG, no qual foi desenvolvido o presente estudo. Assim, diferentes fontes protéicas (caseína, soro de leite e leite em pó) e diversas condições hidrolíticas já foram testadas (MORATO *et al.*, 2000; CARREIRA *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2004; DE MARCO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; DELVIVO *et al.*, 2006).

O objetivo deste trabalho foi obter hidrolisados protéicos de soro de leite ricos em di- e tripeptídeos bem como em peptídeos médios (500Da) e com baixo teor de grandes peptídeos (>1000Da) e de aminoácidos livres, empregando-se a subtilisina. Para isso, foram otimizadas as etapas do processo, visando, também, a redução de custos para adaptação em escala industrial.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

O soro de leite em pó (Kerrylac 700), parcialmente desmineralizado, foi doado pela Kerry do Brasil Ltda (Três Corações, MG, Brasil). A enzima subtilisina (Protemax N200), fornecida pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil), é uma endopeptidase de origem bacteriana (cepa do *B. subtilis*), atividade 200NU/g, estável em pH entre 4,7 e 7,5 com pH ótimo entre 7 e 7,5, temperatura ótima de 55°C e temperatura de inativação acima de 80°C por 20min.

Um agitador magnético (Fisatom, modelo 752A) com temperatura controlada e agitação constante foi utilizado para homogeneizar a mistura. Um liofilizador (Freeze Dry System / FreeZone 4,5, model 77500, LABCONCO) foi usado para secar as amostras. O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usado no fracionamento dos hidrolisados protéicos era constituído por uma coluna cromatográfica PHEA [poli-(2-hidroxietil-aspartamida)-sílica], 250 x 9,4 mm, 5 µm e 200 Å (PolyLC, Columbia, MD, USA), uma bomba isocrática e um detector espectrofotométrico UV-VIS (série HP1100, Waldbronn, Alemanha), acoplado a um computador com software (HPchemstation, Avondale, USA). A água usada no cromatógrafo foi purificada em Sistema de Purificação (Áries Vaponics, Rockland, USA). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico.

Métodos

1 Determinação da composição química do soro de leite

A composição química do soro de leite foi determinada segundo os métodos descritos na AOAC (1995). A umidade foi determinada pelo método de secagem em estufa ventilada (Quimis Q-314M242, série 020, Diadema, SP) a 105 °C até peso constante; as cinzas por incineração, em mufla a 550 °C; os lipídeos, por extração com éter etílico (Soxhlet modificado, Quimis Q-308G26, série 018, Diadema, SP); as proteínas foram determinadas pelo método de micro-Kjeldahl; os carboidratos, por

diferença. O fator de conversão de nitrogênio para proteína usado foi 6,38 (NIELSEN, 1998).

2 Preparo dos hidrolisados enzimáticos do soro de leite

Foram preparados 18 hidrolisados enzimáticos utilizando-se a subtilisina. As soluções a 10% e 15% (p/v) de soro de leite tiveram seu pH ajustado para 7,0 com Na_2CO_3 a 3mol/L e foram colocadas em banho de óleo a 55°C, sob agitação contínua. A enzima foi, então, adicionada em quantidade suficiente para se obter a relação enzima:substrato (E:S) desejada. Após 5h, 10h e 15h de hidrólise, a reação foi interrompida por meio do aumento da temperatura para 85°C por 20 min. Os hidrolisados obtidos foram, então, liofilizados. Algumas das condições de hidrólise estão apresentadas na Tabela 1.

3 Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados de soro de leite

Esta caracterização foi realizada em duas etapas: fracionamento dos peptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia, e sua posterior quantificação.

O fracionamento dos peptídeos foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) em coluna PHEA, conforme descrito por SILVESTRE *et al.* (1994a). As amostras foram dissolvidas em uma concentração de 1g% (p/v) na fase móvel (ácido fórmico a 0,05 mol/L, pH 2,5) e submetidas à cromatografia à temperatura ambiente, sob condições isocráticas, a um fluxo de 0,5 mL/ min, durante 35 min, sendo que um volume injetado foi de 20 μL . A fase móvel foi filtrada, através de membrana de 0,45 μm , e degaseificada imediatamente antes do uso. As frações foram separadas de acordo com o tempo de eluição, sendo F1, de 11,5 a 16,0 min (peptídeos grandes, com mais de 7 resíduos de aminoácidos); F2, de 16,0 a 19,5 min (peptídeos médios, entre 4 e 7 resíduos); F3, de 19,5 a 20,5 min (di- e tripeptídeos); e F4, de 20,5 a 32,0 min (aminoácidos livres).

Tabela I.1- Variáveis hidrolíticas empregadas no preparo de hidrolisados protéicos de soro de leite.

Hidrolisados	Concentração do substrato (p/v)	E:S	Tempo de hidrólise (h)
S1	10	1:100	5
S2	10	2:100	5
S3	10	4:100	5
S4	10	1:100	10
S5	10	2:100	10
S6	10	4:100	10
S7	10	1:100	15
S8	10	2:100	15
S9	10	4:100	15
S10	15	1:100	5
S11	15	2:100	5
S12	15	4:100	5
S13	15	1:100	10
S14	15	2:100	10
S15	15	4:100	10
S16	15	1:100	15
S17	15	2:100	15
S18	15	4:100	15

E:S = relação enzima substrato

O método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF), desenvolvido por SILVESTRE *et al.* (1994b), foi utilizado para quantificar os peptídeos e aminoácidos livres presentes nos hidrolisados do soro de leite. Resumidamente, foram preparados cinco hidrolisados padrão (dois com tripsina e três com pancreatina) que foram fracionados por HPLC de exclusão molecular em coluna PHEA . As quatro frações obtidas foram coletadas (Coletor de Frações, modelo CF-1, Spectrum/Chrom, Houston, TX, EUA) sendo que o solvente foi removido, de cada fração, em evaporador Centrivap (modelo 78100-00D, Labconco, Kansas City, MI, EUA). Posteriormente, as frações foram submetidas à análise de aminoácidos. O cálculo da ACF foi realizado por meio de fórmulas desenvolvidas por SILVESTRE *et al.* (1994b), após a multidetecção das frações a 230nm, 280nm e 300 nm, para se eliminar a interferência devida à absorção

dos aminoácidos aromáticos. Traçou-se, então, uma curva padrão, plotando-se ACF em função do teor de aminoácidos (SILVESTRE *et al.*, 1994b; MORATO *et al.*, 2000; CARREIRA *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2004; DE MARCO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; DELVIVO *et al.*, 2006).

4 Análise estatística

Todos os experimentos foram feitos em 3 repetições e as análises realizadas em triplicata. Para a avaliação das diferenças entre as médias dos teores de peptídeos e aminoácidos livres das frações cromatográficas dos hidrolisados de soro de leite foram realizadas a Análise de Variância (ANOVA fator único) e o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). (PIMENTEL-GOMES, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 Composição química do soro de leite em pó

Tabela I.2- Composição química do soro de leite em pó.

Componentes	Valores obtidos ¹	SILVA <i>et al.</i> (2005) ²	USDA (2006) ³
Umidade (g%)	2,63	3,51	3,19
Proteínas (g%)	13,54	11,82	12,93
Lipídeos (g%)	0,75	0,85	1,07
Cinzas totais (g%)	5,11	8,72	8,35
Açúcares totais (g%)	77,97	67,47	74,46

¹Valores obtidos no soro de leite utilizado no experimento. ²Valores obtidos no soro de leite da Prolácteos Indústria e Comércio Ltda (Contagem, MG, Brasil). ³USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 19, 2006.

Observa-se na Tabela I.2 que, para proteínas, os teores encontrados neste estudo estão próximos dos valores publicados pela USDA (2006) e por SILVA *et al.* (2005), e para lipídeos o valor obtido está mais próximo do citado por SILVA *et al.* (2005). Isto é importante ressaltar, uma vez que diversos fatores como raça das vacas, alimentação (plano de nutrição e forma física da ração), temperatura ambiente, manejo e intervalo entre as ordenhas, produção de leite e infecção da glândula mamária,

podem interferir na composição do leite e, conseqüentemente, na do soro. (EMBRAPA, 2006).

Quanto ao teor de cinzas, o valor obtido no presente trabalho, que é inferior aos relatados na literatura consultada, pode estar relacionado ao fato de ter sido utilizado no experimento soro parcialmente desmineralizado.

2 Caracterização dos hidrolisados de soro de leite

2.1 Perfil peptídico dos hidrolisados protéicos

Os hidrolisados protéicos foram separados em quatro frações (F1, F2, F3 e F4), conforme descrito anteriormente em diversos trabalhos realizados no mesmo laboratório do presente estudo (SILVESTRE *et al.*, 1994b, MORATO *et al.*, 2000, CARREIRA *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2005; DELVIVO *et al.*, 2006; DE MARCO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2006). A fração F1 corresponde aos peptídeos com mais de 7 resíduos de aminoácidos, a fração F2 aos peptídeos médios contendo de 4 a 7 resíduos de aminoácidos, a fração F3 contém os di- e tripeptídeos e a fração F4 os aminoácidos livres. A título de exemplo, o perfil cromatográfico do hidrolisado S1, a 230nm, está apresentado na Figura 1.1.

A técnica de SE-HPLC, utilizada no presente trabalho, foi eficiente na caracterização de hidrolisados protéicos, especialmente quando o interesse está voltado para o fracionamento de peptídeos de baixas massas moleculares, ou seja, inferiores a 1000Da. Estes resultados confirmam mais uma vez, os obtidos no mesmo laboratório do presente estudo, para o fracionamento e a quantificação de hidrolisados de proteínas utilizando o soro de leite (DE MARCO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; DELVIVO *et al.*, 2006) e outras fontes protéicas como caseína (MORATO *et al.*, 2000; CARREIRA *et al.*, 2004; MORAIS *et al.*, 2005; BARBOSA *et al.*, 2004), leite (LOPES *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2006) e arroz (BIZZOTTO *et al.*, 2006).

Na literatura, são encontradas diversas técnicas para o fracionamento dos peptídeos de hidrolisados protéicos, como por exemplo, eletroforese em gel de poliacrilamida-sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE) (SCHIMIDT & POLL, 1991; SCHIMIDT & MARKWIJK, 1993; GALLAGHER *et al.*, 1994) cromatografia de exclusão molecular (SEC) (DEESLIE & CHERYAN 1991), HPLC capilar (DAVIS & LEE, 1992), HPLC de troca de iônica (AE-HPLC) (DIZDAROGLU, 1985) e HPLC de exclusão molecular (SE-HPLC) empregando coluna TSK G-2000 SW (6 x 7,5 cm) (LEMIEUX *et al.*, 1991) e coluna Superose -12HR 10/30 (GOLOVCHENKO *et al.*, 1992; VISSER *et al.*, 1992).

Entretanto, ao contrário da técnica aqui utilizada, a maioria destes métodos apresentam uma série de inconvenientes. LEMIEUX *et al.* (1991), empregando a SE-HPLC com uma coluna TSK G-2000 SW, e DAVIS & LEE (1992), empregando a HPLC capilar, relataram a dificuldade de separar os peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, tendo observado uma superposição de compostos com pesos moleculares diferentes.

VISSER *et al.* (1992) e GOLOVCHENKO *et al.* (1992), também utilizando SE-HPLC, porém com uma coluna Superose -12HR 10/30, verificaram a ocorrência de interações eletrostáticas e/ ou hidrofóbicas entre os solutos e a fase estacionária. SCHIMIDT & POLL (1991), empregando a SDS-PAGE, relataram a dificuldade de detectar pequenos peptídeos (<2000Da) pela técnica utilizada uma vez que os peptídeos, devido à fixação insuficiente, são removidos durante os procedimentos de revelação e lavagem do gel.

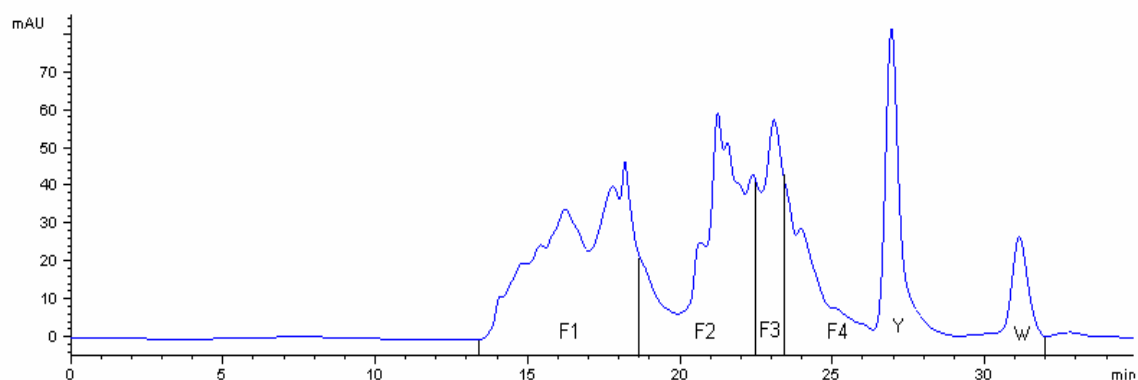


Figura I.1 - Perfil cromatográfico do hidrolisado S1 a 230 nm.

F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Y = pico da tirosina, W = pico do triptofano. Hidrolisado S1: substrato a 10%; tempo de hidrólise = 5h; relação E:S = 1%.

2.2 Teor de peptídeos e aminoácidos livres dos hidrolisados

Observa-se na Tabela I.3 que, para alguns hidrolisados, a distribuição de peptídeos foi semelhante, não havendo diferenças significativas entre os seus teores de peptídeos e de aminoácidos livres. Este é o caso observado quando se compara S1 com S2; S5 com S7 e com S16; S11 com S12; S14 com S15.

Os hidrolisados S10 e S17 apresentaram os melhores resultados, uma vez que ambos obtiveram elevados teores de di- e tripeptídeos (média 10,8%) e peptídeos com massa molecular média de 500Da (média 30,7%). Com relação ao teor de aminoácidos

livres, o S10 foi mais vantajoso que o S17 pois apresentou menor valor (15,37% e 35,29%, respectivamente), enquanto que o S17 destaca-se pelo seu baixo conteúdo de grandes peptídeos (22,91%) em relação ao S10 (43,21%).

Tabela I.3 – Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados de soro de leite obtidos pela ação da subtilisina.

Hidrolisados	F1	F2	F3	F4
S1	45,91 ^{g/1}	18,38 ^{cdef/3}	7,15 ^{cb/4}	28,54 ^{b/2}
S2	46,84 ^{g/1}	17,72 ^{cdef/3}	7,88 ^{cd/4}	27,54 ^{bc/2}
S3	43,65 ^{h/1}	19,97 ^{cd/3}	7,96 ^{cd/4}	28,39 ^{b/2}
S4	54,86 ^{c/1}	18,60 ^{cdef/2}	8,51 ^{abc/3}	18,00 ^{g/2}
S5	48,98 ^{f/1}	17,10 ^{ef/3}	8,30 ^{bc/4}	25,56 ^{cd/2}
S6	42,70 ^{h/1}	20,31 ^{c/3}	8,09 ^{cd/4}	28,87 ^{b/2}
S7	49,90 ^{ef/1}	17,86 ^{cdef/3}	8,34 ^{bc/4}	23,87 ^{de/2}
S8	46,58 ^{g/1}	19,89 ^{cde/3}	8,09 ^{cd/4}	25,42 ^{cd/2}
S9	40,03 ^{i/1}	24,90 ^{b/2}	8,18 ^{cd/3}	26,88 ^{bc/2}
S10	43,21 ^{h/1}	30,53 ^{a/2}	10,89 ^{a/4}	15,37 ^{h/3}
S11	55,17 ^{c/1}	17,49 ^{def/3}	6,86 ^{cd/4}	20,40 ^{f/2}
S12	54,84 ^{c/1}	17,70 ^{cdef/3}	6,22 ^{cd/4}	21,19 ^{ef/2}
S13	58,66 ^{b/1}	17,60 ^{def/2}	5,49 ^{d/3}	18,23 ^{g/2}
S14	52,63 ^{d/1}	16,80 ^{f/3}	6,27 ^{cd/4}	24,29 ^{d/2}
S15	51,97 ^{de/1}	17,40 ^{def/3}	6,12 ^{cd/4}	24,48 ^{d/2}
S16	49,74 ^{f/1}	16,97 ^{f/3}	6,45 ^{cd/4}	26,83 ^{bc/2}
S17	22,91 ^{j/3}	31,00 ^{a/2}	10,77 ^{ab/4}	35,29 ^{a/1}
S18	77,36 ^{a/1}	11,96 ^{g/2}	2,77 ^{e/4}	7,90 ^{i/3}

Todos os valores são apresentados em % nmols das quatro frações. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de significância na comparação de diferentes frações de um mesmo hidrolisado (linha). Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de significância na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados (coluna).

Não foram encontrados na literatura dados abordando a ação da subtilisina sobre o perfil peptídico de hidrolisados de soro de leite. Entretanto, a ação desta enzima, sobre o perfil peptídico de hidrolisados de caseína foi, anteriormente, avaliada em um estudo no mesmo laboratório do presente trabalho, mas empregando-se condições diferentes para o preparo dos hidrolisados e da enzima.

Assim, MORATO *et al.* (2000), empregando uma subtilisina (Carlsberg, P5380, Sigma) para hidrolisar a caseína, obtiveram elevados teores de di- e tripeptídeos (36%) e de peptídeos com massa molecular média de 500Da (46,6%), além de baixos conteúdos de grandes peptídeos (14%) e aminoácidos livres (4%). Estes valores foram muito superiores aos encontrados no presente estudo, no qual os melhores resultados obtidos para os hidrolisados S10 e S17, apresentaram, em média, 10,89% e 30,53% de di- e tripeptídeos e 30,53% e 31% de peptídeos com massa molecular média de 500Da, respectivamente. Entretanto, estes autores utilizaram uma concentração de substrato cerca de 120 vezes menor do que a empregada neste trabalho (0,125%), o que eleva em demasia os custos para adaptação para escala industrial.

LOOSEN *et al.*, (1991) também utilizando a subtilisina de Calrsberg na hidrólise da caseína, encontraram hidrolisados com 75 a 85% de di- e tripeptídeos e menos que 4% de aminoácidos livres. Estes resultados foram melhores que os obtidos neste trabalho. Porém, esses autores empregaram a ultrafiltração (UF) a fim de remover os peptídeos maiores que 1000Da o que justifica o aumento na concentração de oligopeptídeos. Por outro lado a UF apresenta a desvantagem de encarecer o processo, dificultando a sua aplicação em larga escala.

3. Comparação entre os diferentes tratamentos enzimáticos

Não foram encontrados na literatura dados abordando o efeito dos parâmetros hidrolíticos empregados na ação da subtilisina sobre o soro de leite. Sendo assim, os resultados aqui obtidos foram comparados com os relatados para ação desta enzima sobre a caseína. Mesmo assim, nestes estudos o efeito da concentração do substrato não foi avaliado.

Todos os parâmetros foram analisados levando-se em consideração a redução de custos do processo para adaptação em escala industrial. O aumento da concentração do substrato está associado à redução da quantidade de água e, conseqüentemente, do tempo gasto no processo de secagem; a redução da relação E:S está associada ao emprego de menor quantidade de enzima necessária para a hidrólise; a redução do tempo de hidrólise está relacionada à diminuição de contaminação bacteriana, à redução de formação de produtos de degradação, além de menor consumo de energia.

3.1.1 Efeito da concentração do substrato

Para analisar o efeito da concentração inicial do soro de leite sobre o perfil peptídico dos hidrolisados protéicos, devem ser comparados os seguintes hidrolisados: S1 com S10, S2 com S11, S3 com S12, S4 com S13, S5 com S14, S6 com S15, S7 com S16, S8 com S17 e S9 com S18, uma vez que os parâmetros tempo de hidrólise, relação E:S, pH e temperatura são mantidos constantes. Em cada uma das partes A, B e C da Figura I.2, estão apresentados três destes grupos.

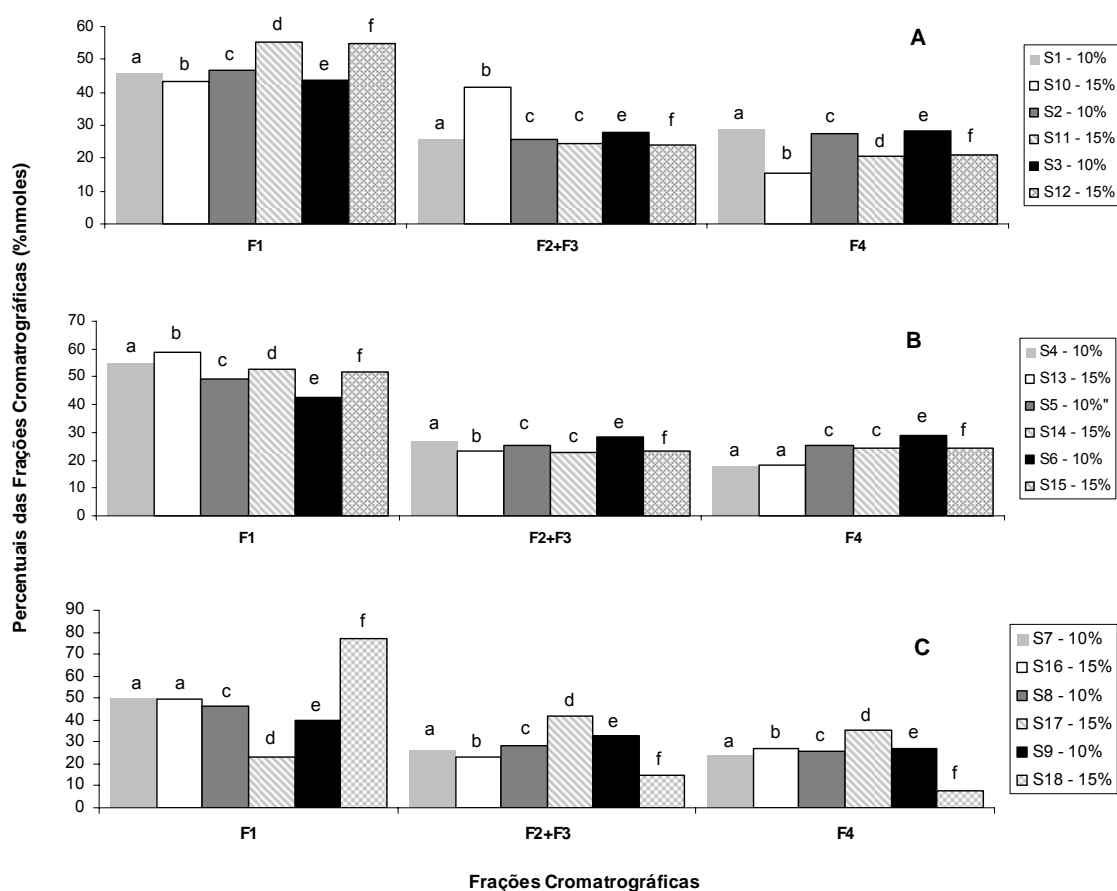


Figura I.2: Efeito da concentração do substrato sobre o perfil peptídico de hidrolisados de soro de leite. Concentrações utilizadas: 10% (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9) e 15% (S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17, S18). F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2+F3: oligopeptídeos (2 a 7 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

Observa-se na Figura I.2 que a vantagem da utilização de uma maior concentração do substrato ocorreu em alguns casos e relaciona-se a elevação do teor de oligopeptídeos (S1 com S10; S8 com S17), e a queda nos teores de grandes peptídeos (S1 com S10; S8 com S17) e de aminoácidos livres (S1 com S10; S2 com

S11; S3 com S12; S6 com S15; S9 com S18) ao se aumentar a concentração de 10% para 15%.

3.1.2 Efeito da relação E:S

A influência da relação E:S na ação da subtilisina sobre o soro de leite pode ser avaliada na Figura I.3. No intuito de manter os demais parâmetros hidrolíticos constantes, a análise dos dados deve considerar seis grupos contendo, cada um, três hidrolisados: grupo 1 (S1, S2 e S3); grupo 2 (S4, S5 e S6); grupo 3 (S7, S8 e S9); grupo 4 (S10, S11 e S12) grupo 5 (S13, S14 e S15) e grupo 6 (S16, S17 e S18). Em cada uma das partes A, B e C da Figura I.3, estão apresentados dois destes grupos.

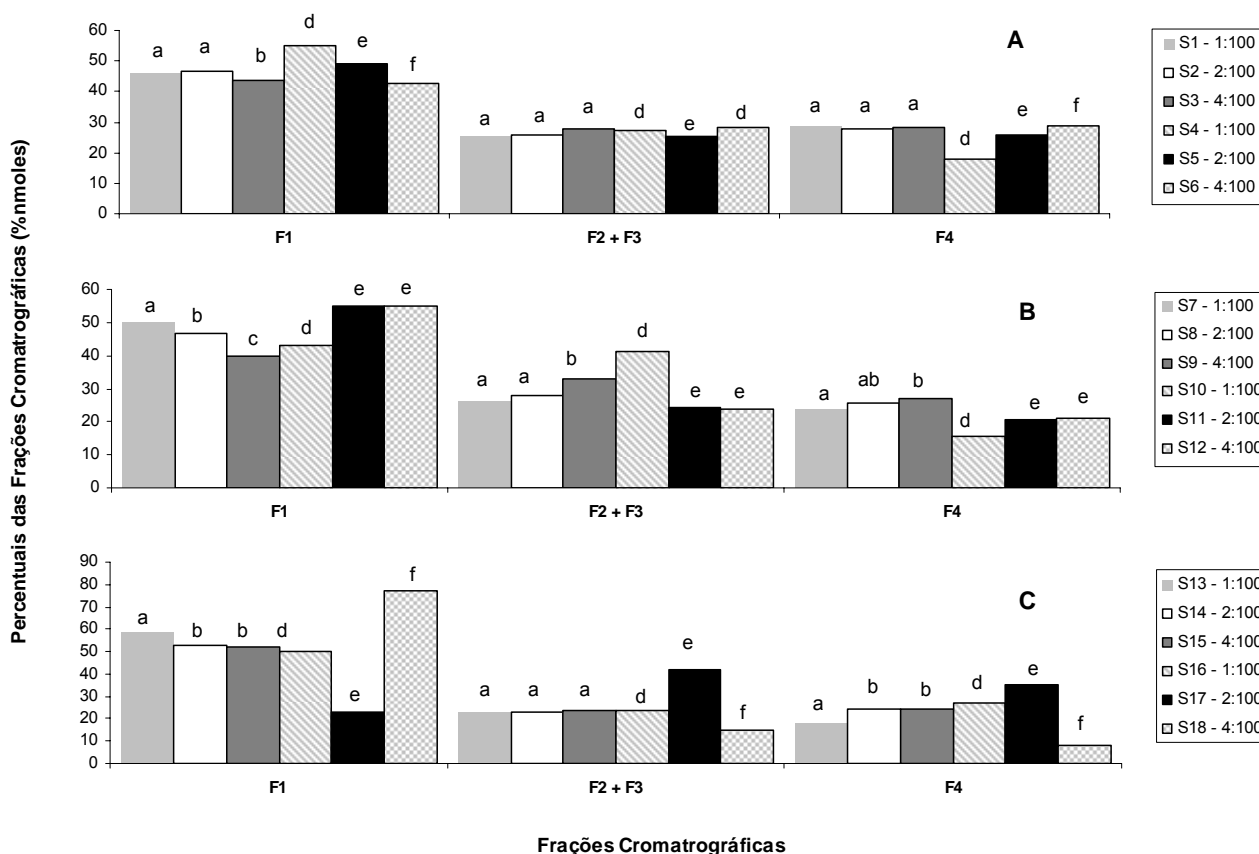


Figura I.3: Efeito da relação E:S sobre o perfil peptídico de hidrolisados de soro de leite. Relações E:S utilizadas: 1:100 (S1, S4, S7, S10, S13, S16), 2:100 (S2, S5, S8, S11, S14, S17) e 4:100 (S3, S6, S9, S12, S15, S18) F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2+F3: oligopeptídeos (2 a 7 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

Observa-se que o efeito benéfico devido à utilização de uma menor relação E:S ocorreu em um caso relacionado com a elevação do teor de oligopeptídeos, quando a

E:S passou de 4:100 para 2:100 (S18 e S17) e, em dois casos ao passar de 2:100 para 1:100 (S5 e S4; S11 e S10). Além disso, a redução do teor de grandes peptídeos foi obtida em apenas um caso quando a relação E:S passou de 4:100 para 2:100 (S18 e S17) e, em outro caso, quando passou de 2:100 para 1:100 (S11 e S10). Os menores teores de aminoácidos livres foram obtidos em apenas em um caso quando a E:S foi reduzida de 4:100 para 2:100 (S5 e S6), e em quatro casos quando foi reduzida de 2:100 para 1:100 (S5 e S4; S11 e S10; S14 e S13; S17 e S16).

Por outro lado, em estudo realizado anteriormente no mesmo laboratório, não foi observado qualquer efeito benéfico associado à utilização de uma menor relação E:S, na ação da subtilisina sobre a caseína (MORATO *et al.*, 2000). Assim, ao reduzir a relação E:S de 4:100 para 2:100, estes autores observaram a elevação nos teores de grandes peptídeos (de 14% para 30%) e de aminoácidos livres (de 4% para 16%), além de decréscimo no conteúdo de oligopeptídeos (de 82% para 54%).

3.1.3 Efeito do tempo de hidrólise

A influência do tempo de ação da subtilisina sobre o soro de leite pode ser avaliada na Figura I.4. No intuito de manter os demais parâmetros hidrolíticos constantes, a análise dos dados deve considerar seis grupos contendo, cada um, três hidrolisados: grupo 1 (S1, S4 e S7); grupo 2 (S2, S5 e S8); grupo 3 (S3, S6 e S9); grupo 4 (S10, S13 e S16) grupo 5 (S11, S14 e S17) e grupo 6 (S12, S15 e S18). E cada uma das partes A, B e C da Figuras I.4, estão apresentados dois destes grupos.

Observa-se que o efeito benéfico devido à utilização de um menor tempo de hidrólise ocorreu em um caso relacionado com a elevação do teor de oligopeptídeos quando o tempo passou de 15h para 10h (S18 e S15) e, em um caso, ao passar de 10h para 5h (S13 e S10). Além disso, a redução do teor de grandes peptídeos foi obtida em um caso quando o tempo passou de 15h para 10h (S18 e S15) e, em três casos, quando passou de 10h para 5h (S4 e S1; S5 e S2; S13 e S10). Os menores teores de aminoácidos livres foram obtidos em três casos quando o tempo foi reduzido de 15h para 10h (S7 e S4; S16 e S13; S17 e S14) e, em três casos, quando foi reduzido de 10h para 15h (S13 e S10; S14 e S11; S15 e S12).

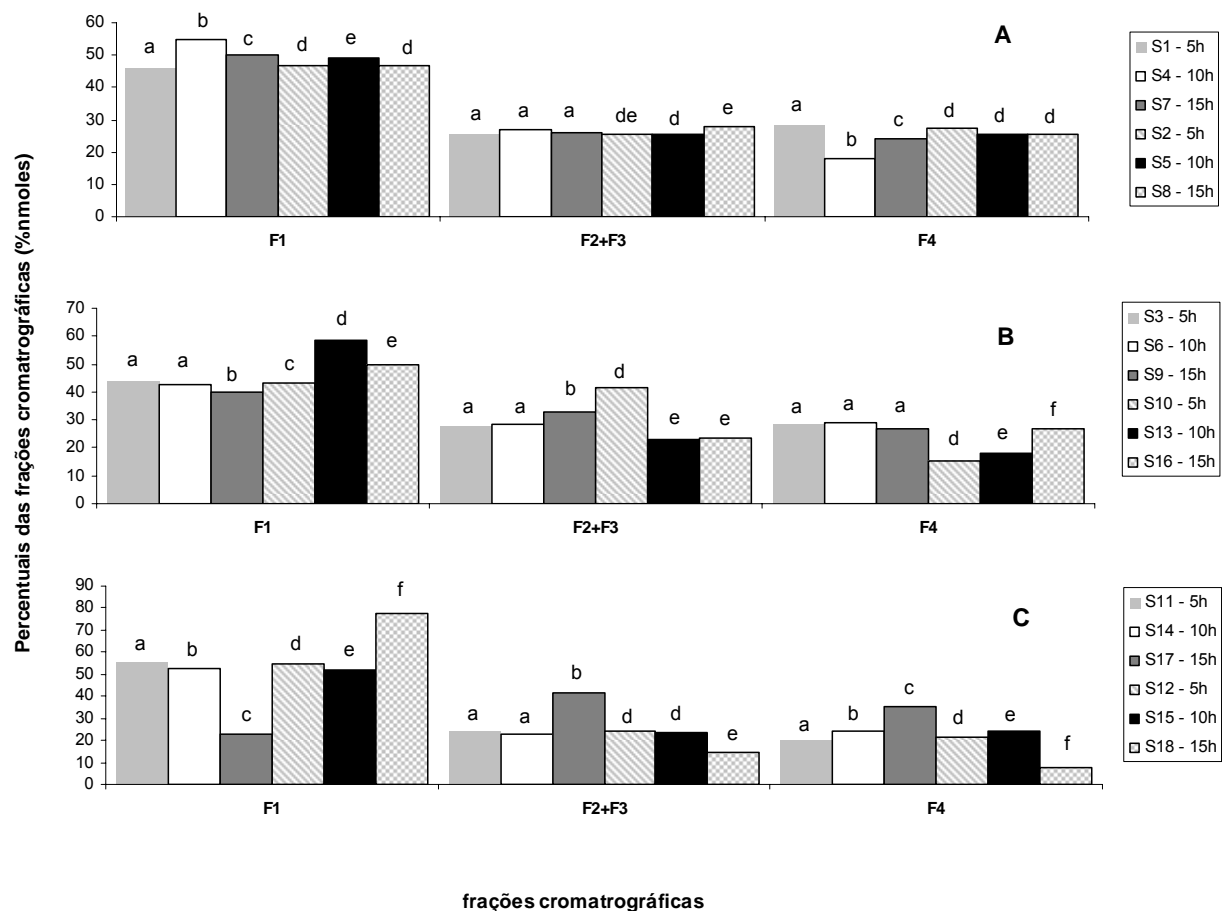


Figura I.4: Efeito do tempo de hidrólise sobre o perfil peptídico de hidrolisados de soro de leite. Tempos utilizados: 5h (S1, S2, S3, S10, S11, S12), 10h (S4, S5, S6, S13, S14, S15) e 15h (S7, S8, S9, S16, S17, S18). F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2+F3: oligopeptídeos (2 a 7 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

CONCLUSÃO

A ação da subtilisina foi eficiente na produção de hidrolisados de soro de leite, ricos em oligopeptídeos e pobres em grandes peptídeos e aminoácidos livres, tendo atingido teores de oligopeptídeos superiores a 40%. Dentre os parâmetros testados, o efeito benéfico da utilização de uma maior concentração do substrato e de menores relação E:S e do tempo de reação, levando a um maior teor de oligopeptídeos, foi observado em vários casos. O melhor perfil peptídico foi obtido ao se empregar 15% de substrato, E:S de 1:100 e 5h de hidrólise, o que corresponde, igualmente, à condição mais vantajosa, do ponto de vista econômico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) *Official methods of analysis of AOAC international*. 16 ed. Arlington: AOAC International, 1995. 2v.
- BARBOSA, C.M.S.; MORAIS, H.A.; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres, *J. Sci. Food Agric.*, v. 84, n. 14, p. 1891-1900, 2004.
- BIZZOTTO, C.S.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, V.D.M.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da corolase pp e uso do carvão ativado. *Rev. Ciênc. Agrotecnol.*, v. 30, n. 2, p. 308-316, 2006.
- BOZA, J. J.; MOËNNOZ, D.; VUICHOU, J.; JARRET, A. R.; GAUDARD-DE-WECK, D.; BALLÈVRE, O. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur. J. Nutr.*, v. 39, p. 237-243, 2000.
- CARREIRA, R.L.; DE MARCO, L.M.; DIAS, D.R.; MORAIS, H.A.; SILVESTRE, M.P.C. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. *Acta Farm. Bon.*, v. 23, n. 1, p. 17-25, 2004.
- CHERYAN, M. *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. Illinois: Technomic Publishing Co, 1998, 527p.
- DAVIS, M.T.; LEE, T. D. Analysis of peptide mixtures by capillary high performance liquid chromatography: A practical guide to small-scale separations. *Prot. Sci*, v.1, p.935-944, 1992.
- DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Uso do carvão ativado para remoção de fenilalanina de hidrolisados protéicos, obtidos pela ação da papaína imobilizada. *Braz. J. Food Technol.*, v. 8, n. 3, p. 210-219, 2005.
- DELVIVO, F.M.; VIEIRA, C.R.; BIASUTTI, E.A.R.; AFONSO, W.O.; SILVESTRE, M.P.C. Evaluating the effect of adsorption medium, hydrolytic parameters and ultrafiltration on the phenylalanine removal from pancreatic whey hydrolysates. *Am. J. Food Technol.*, v. 1, n. 2, p. 94-104, 2006.

- DEESLIE, W.D; CHERYAN, M. Fractionation of soy protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *J. Agric. Food Sci.*, v. 57, n. 2, p. 26 - 31, 1991.
- DIZDAROGLU, M. Weak anion-exchange high-performance liquid chromatography of peptides. *J. Chromatog.*, v. 334, p. 49-69, 1985.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Agência de informação - Agronegócio do leite. Disponível em:< http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html>. Acesso em: 20 set. 2006.
- GALLAGHER, J.; KANEKANIAN, A.D.; EVANS E.P. Hydrolysis of casein: a comparative study of two proteases and their peptide maps. *Int. J. Food Sci. Tech.*, v.29, p. 279-285, 1994.
- GAUTHIER, S.F. & POULIOT, Y. Functional and biological properties obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, v.86, p.78-87, 2003.
- GOLOVCHENKO, N, KATAEVA, I. A, AKIMENKO, V. K. Analysis of pH-dependent protein interactions with gel filtration medium. *J. Chromatogr.*, v. 591, n. 4, p.121-128, 1992.
- GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSKI Jr., M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v. 71, n. 1, p. 65-9, 1986.
- KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R. C. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut.*, v. 26, p .907 - 913, 1985.
- LEMIEUX, L.; PIOT, J.M., GUILLOCHON, D; AMIOT, J. Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *J. Chromatogr.*,v. 32, p.499-504, 1991.
- LOOSEN, P.C.; BRESSPOLLIER, P. R.; JULIEEN, A. R.; PEJOAN, C. H.; VERNEUIL, B. *Procede pour preparer um hydrolysat enzymatique*. Tessenderlo Cheemie n. v. [BE/BE]; Stationsstraat, B-3980 Tessenderlo (BE). A23J3/34, C12P21/06 C12S3/14, C07K15/00//A61K37/18, A23J3/04, 3/14. FR-PCT/BE91/00001, W091/10369. 11/01/1991; 25/07/1991.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C. Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. *Brit. Food J.*, v. 107, n. 1, p. 42-53, 2005.

- MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 69, p. 1163 - 1169, 1992.
- MORAIS, H.A.; DE MARCO, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alim.*, v. 34, n. 1, p. 59-69, 2005.
- MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J. Food Comp. and Anal.*, v.13, p.843-857, 2000.
- NIELSEN S.S. *Food Analysis*. Gaithersburg: Aspen Publisher, 1998. 630 p.
- PACHECO, M.T.B; DIAS N.F.G; BALDINI, V.L; TANIKAWA, C & SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos do soro de leite. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.25, n.2, p.333-338, 2005.
- PEARCE, R.J. Food functionality success or failure for dairy based ingredients. *Aust. J. Dairy Technol.*, v. 50, n. 1, p. 15-23, 1995.
- PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci Technol.*, v.11, p.347-356, 2001.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 14 ed. Piracicaba, 2000. 477p.
- RERAT, A. A. Nutritional supply of proteins and absorption of their hydrolysis products: consequences on metabolism *Pro. Nutr. Soc.*, v. 52, p. 335-344, 1993.
- SCHMIDT, D.G.; MARKWIJK, B.W.V. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Influence of heat treatment of α -lactalbumin and β -lactoglobulin on their proteolysis by pepsin and papain. *Neth. Milk Dairy J.*, v. 47, p.15-22, 1993
- SCHMIDT, D.G, POLL, J.K. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Neth. Milk Dairy J.*, v. 45, n. 4, p. 225-240, 1991.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Rev. Nutr.*, v. 17, no.4, p. 397-409, 2004.
- SGARBIERI, V. C. *Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações*. São Paulo: Varela, 1996. 517p.

- SILVA, V.D.M.; DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; AGUIAR, M. Jb; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego da pancreatina imobilizada no preparo de hidrolisados de soro de leite com teor reduzido de fenilalanina. *Alim. Nutr.*, v. 16, n. 1, p. 21-31, 2005.
- SILVESTRE, M. P. C., HAMON, M.; YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, n. 12, p. 2778-2782, 1994a.
- SILVESTRE, M. P. C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J. Agric. Food Chem.*, v.42, n.12, p.2783-2789, 1994b.
- SISO M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Biores. Technol.*, v. 57, p. 1-11, 1996.
- SOARES, R.D.L.; BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C.R.; SILVA, V.D.M.; JANUÁRIO, J.N. ; AGUIAR, M.JB. ; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farm. Bon.*, v. 25, n. 3, p. 325-332, 2006.
- USDA (United States Department of Agriculture). Nutrient Data Laboratory. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>> acesso em 24/11/2006.
- USDEC News Ingredients. *Versatilidade dos ingredientes lácteos*, v. 4, n. 4, São Paulo, 2002.
- VIJAYALAKSHIMI, M.A.; LEMIEUX, L.; AMIOT, J. High performance size exclusion liquid chromatography of small molecular weight peptides from protein hydrolysates using methanol as a mobile phase additive. *J. Liq. Chromatogr.*, v. 9, p. 3559-3576, 1986.
- VISSER, S., SLAGEN, C. J., ROBBEN, A. J. P. M. Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr.*, v. 599, p. 205 - 209, 1992.

CAPITULO II

UTILIZAÇÃO DA PANCREATINA NA HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE PARA OBTER ELEVADO TEOR DE OLIGOPEPTÍDEOS

RESUMO

Vários hidrolisados enzimáticos de soro de leite foram preparados visando a elevação do teor de oligopeptídeos e a redução de custos para produção em larga escala. Para isso, empregou-se a pancreatina e alguns parâmetros hidrolíticos como o tempo de reação (5h, 10h e 15h), a relação E:S (1:100, 2:100 e 4:100) e a concentração do substrato (10% e 15%) foram testados. Os hidrolisados foram fracionados por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) e, para a quantificação dos componentes das frações cromatográficas, empregou-se o método rápido da Área Corrigida da Fração. Para os parâmetros estudados, observou-se efeito benéfico sobre o perfil peptídico, sendo que o melhor resultado, associado, principalmente, ao maior teor de oligopeptídeos (49,00%) e ao menor conteúdo de aminoácidos livres (22,00%), foi obtido quando se empregou a concentração do substrato a 10%, a relação E:S de 4:100 e o tempo de reação de 10h.

Palavras chave: hidrolisados, pancreatina, soro de leite, oligopeptídeos, perfil peptídico.

ABSTRACT

USE OF PANCREATIN FOR HYDROLYSING WHEY PROTEINS AND OBTAINING HIGH OLIGOPEPTIDE CONTENTS. Several enzymatic hydrolysates of whey were prepared with the objective of increasing the oligopeptide content and reducing the cost of large scale production. Pancreatin was used and some hydrolytic parameters such as reaction time (5h, 10h and 15h), enzyme:substrate ratio (E:S) (1:100, 2:100 and 4:100) and substrate concentration (10% and 15%) were tested. The hydrolysates were fractionated by size-exclusion-HPLC and the rapid corrected fraction area method was used for quantifying the chromatographic fractions. The beneficial effect on the peptide profile was observed in several cases, and it was mainly associated with higher oligopeptide (49%) and lower amino acid (22%) contents, which were obtained for a substrate concentration of 10%, E:S ratio of 4:100 and reaction time of 10h.

Key words: hydrolysates, pancreatin, whey, oligopeptide, peptide profile.

INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, o soro era considerado pelos produtores de queijo como um subproduto da fabricação, com baixo ou nenhum valor comercial. Porém, esta visão mudou com a descoberta de propriedades funcionais e bioativas de seus componentes (WALZEN *et al.*, 2002).

As proteínas do soro do leite têm sido apontadas como nutrientes portadoras de atividade funcional, capazes de modular algumas respostas fisiológicas do organismo animal (PACHECO *et al.*, 2006; SGARBIERI, 2004; GAUTHIER & POULIOT, 2003; PIHLANTO-LAPPÄLLÄ, 2001).

Entretanto, a despeito das várias possibilidades de utilização do soro, que têm sido descobertas nos últimos 50 anos, aproximadamente metade da produção mundial de soro é descartada em efluentes sem qualquer tratamento. Desta forma, devido a sua alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), associada, principalmente, à presença de lactose e proteínas, constitui-se num forte agente de poluição ambiental (SISO, 1996; CHERYAN, 1998). Portanto, este trabalho representa uma importante contribuição no sentido de criar opções para utilização do soro do leite.

O tratamento enzimático contribui para a melhoria das propriedades físicas, químicas, funcionais, organolépticas e nutricionais das proteínas, atuando, particularmente, nas características de absorção protéica. Diversos autores têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente de di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres, apresentando, assim, um maior valor nutritivo (KEOHANE *et al.*, 1985; GRIMBLE *et al.*, 1986; RÉRAT, 1993; BOZA *et al.*, 2000).

A avaliação dos teores de peptídeos em hidrolisados protéicos envolve, inicialmente, o fracionamento das amostras. Neste sentido, várias técnicas cromatográficas têm sido descritas na literatura, mas estas apresentam inúmeros inconvenientes, tais como interações entre o soluto e a fase estacionária e a ineficiência em separar os pequenos peptídeos (LEMIEUX *et al.*, 1991; SCHIMIDT & POLL, 1991; DAVIS & LEE, 1992; GOLOVCHENKO *et al.*, 1992; VISSER *et al.*, 1992).

SILVESTRE *et al.* (1994a) desenvolveram um método eficiente para fracionamento e quantificação dos peptídeos, empregando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli (2-hidroxietil-aspartamido)-sílica (PHEA), que lhes possibilitou separar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000Da, sendo este método empregado no presente trabalho.

O perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos de diferentes fontes protéicas (caseína, soro de leite e leite em pó) e diversas condições hidrolíticas, vêm sendo estudados no laboratório de Bromatologia / Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG, no qual foi desenvolvido o presente estudo (MORATO *et al.*, 2000; CARREIRA *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2004; DE MARCO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; DELVIVO *et al.*, 2006).

Este trabalho teve como objetivo otimizar as condições hidrolíticas, a fim de reduzir os custos para adaptação em escala industrial e obter hidrolisados de soro de leite com elevado teor de di- e tripeptídeos e peptídeos médios (500Da), bem como com baixos teores de grandes peptídeos (>1000Da) e de aminoácidos livres.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

O soro de leite em pó (Kerrylac 700), parcialmente desmineralizado, foi doado pela Kerry do Brasil Ltda (Três Corações, MG, Brasil). A enzima pancreatina (Corolase PP), fornecida pela AB Enzymes® (Barueri, SP, Brasil), é uma enzima mista, de origem animal (pâncreas suíno), atividade 2000.000 LVE/g, estável em pH neutro ou ligeiramente alcalino, pH ótimo entre 7 e 9 com temperatura ótima entre 35-50°C.

Um agitador magnético (Fisatom, modelo 752A) com temperatura controlada e agitação constante foi utilizado para homogeneizar a mistura. Um liofilizador (Freeze Dry System / FreeZone 4,5, model 77500, LABCONCO) foi usado para secar as amostras. O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usado no fracionamento dos hidrolisados protéicos era constituído por uma coluna cromatográfica PHEA [poli-(2-hidroxietil-aspartamida)-sílica], 250 x 9,4 mm, 5 µm e 200 Å (PolyLC, Columbia, MD, USA), uma bomba isocrática e um detector espectrofotométrico UV-VIS (série HP1100, Waldbronn, Alemanha), acoplado a um computador com software (HPchemstation, Avondale, USA). A água usada no cromatógrafo foi purificada em Sistema de Purificação (Áries Vaponics, Rockland, USA). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico.

Métodos

1 Determinação da composição química do soro de leite

A composição química do soro de leite foi determinada segundo os métodos descritos na AOAC (1995). A umidade foi determinada pelo método de secagem em estufa ventilada (Quimis Q-314M242, série 020, Diadema, SP) a 105 °C até peso constante; as cinzas, por incineração, em mufla a 550 °C; os lipídeos, por extração com éter etílico (Soxhlet modificado, Quimis Q-308G26, série 018, Diadema, SP); as proteínas foram determinadas pelo método de micro-Kjeldahl; os carboidratos, por diferença. O fator de conversão de nitrogênio para proteína usado foi 6,38 (NIELSEN, 1998).

2 Preparo dos hidrolisados enzimáticos do soro de leite

Foram preparados 18 hidrolisados enzimáticos utilizando-se a pancreatina. As soluções a 10% e 15% (p/v) de soro de leite tiveram seu pH ajustado para 7,0 com Na_2CO_3 a 3mol/L e foram colocadas em banho de óleo a 50°C, sob agitação contínua. A enzima foi, então, adicionada em quantidade suficiente para se obter a relação enzima:substrato (E:S) desejada. Após 5h, 10h e 15h de hidrólise, a reação foi interrompida por meio do aumento da temperatura para 85°C por 20 min. Os hidrolisados obtidos foram liofilizados. Algumas condições de hidrólise estão apresentadas na Tabela II.1.

3 Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados de soro de leite

Esta caracterização foi realizada em duas etapas: fracionamento dos peptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia, e sua posterior quantificação.

Tabela II.1 – Variáveis hidrolíticas empregadas no preparo de hidrolisados protéicos de soro de leite.

Hidrolisados	Concentração do substrato (p/v)	E:S	Tempo de hidrólise (h)
P1	10	1:100	5
P2	10	2:100	5
P3	10	4:100	5
P4	10	1:100	10
P5	10	2:100	10
P6	10	4:100	10
P7	10	1:100	15
P8	10	2:100	15
P9	10	4:100	15
P10	15	1:100	5
P11	15	2:100	5
P12	15	4:100	5
P13	15	1:100	10
P14	15	2:100	10
P15	15	4:100	10
P16	15	1:100	15
P17	15	2:100	15
P18	15	4:100	15

E:S = relação enzima substrato

O fracionamento dos peptídeos foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) em coluna PHEA, conforme descrito por SILVESTRE *et al.* (1994a). As amostras foram dissolvidas em uma concentração de 1g% (p/v) na fase móvel (ácido fórmico a 0,05 mol/L, pH 2,5) e submetidas à cromatografia à temperatura ambiente, sob condições isocráticas, a um fluxo de 0,5 mL/ min, durante 35 min, sendo que o volume injetado foi de 20µL. A fase móvel foi filtrada, através de membrana de 0,45 µm, e degaseificada imediatamente antes do uso. As frações foram separadas de acordo com o tempo de eluição, sendo F1, de 11,5 a 16,0 min (peptídeos grandes, com mais de 7 resíduos de aminoácidos); F2, de 16,0 a 19,5 min (peptídeos médios, entre 4 e 7 resíduos); F3, de 19,5 a 20,5 min (di- e tripeptídeos); e F4, de 20,5 a 32,0 min (aminoácidos livres).

O método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF), desenvolvido por SILVESTRE *et al.* (1994b), foi utilizado para quantificar os peptídeos e aminoácidos livres presentes nos hidrolisados do soro de leite. Resumidamente, foram preparados cinco hidrolisados padrão (dois com tripsina e três com pancreatina) que foram fracionados por HPLC de exclusão molecular em coluna PHEA. As quatro frações obtidas foram coletadas (Coletor de Frações, modelo CF-1, Spectrum/Chrom, Houston, TX, EUA) sendo que o solvente foi removido, de cada fração, em evaporador Centrivap (modelo 78100-00D, Labconco, Kansas City, MI, EUA). Posteriormente, as frações foram submetidas à análise de aminoácidos. O cálculo da ACF foi realizado por meio de fórmulas desenvolvidas por SILVESTRE *et al.* (1994b), após a multidetecção das frações a 230nm, 280nm e 300 nm, para se eliminar a interferência devida à absorção dos aminoácidos aromáticos. Traçou-se, então, uma curva padrão, plotando-se ACF em função do teor de aminoácidos (SILVESTRE *et al.*, 1994b; MORATO *et al.*, 2000; CARREIRA *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2004; DE MARCO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; DELVIVO *et al.*, 2006).

4 Análise estatística

Todos os experimentos foram feitos em 3 repetições e as análises realizadas em triplicata. Para a avaliação das diferenças entre as médias dos teores de peptídeos e aminoácidos livres das frações cromatográficas dos hidrolisados de soro de leite foram realizadas a Análise de Variância (ANOVA fator único) e o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). (PIMENTEL-GOMES, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 Composição química do soro de leite em pó

Tabela II.2 - Composição química do soro de leite em pó.

Componentes	Valores obtidos ¹	SILVA <i>et al.</i> (2005) ²	USDA (2006) ³
Umidade (g%)	2,63	3,51	3,19
Proteínas (g%)	13,54	11,82	12,93
Lipídeos (g%)	0,75	0,85	1,07
Cinzas totais (g%)	5,11	8,72	8,35
Açúcares totais (g%)	77,97	67,47	74,46

¹Valores obtidos no soro de leite utilizado no experimento. ²Valores obtidos no soro de leite da Prolácteos Indústria e Comércio Ltda (Contagem, MG, Brasil). ³USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 19, 2006.

Diversos fatores como raça das vacas, alimentação (plano de nutrição e forma física da ração), temperatura ambiente, manejo e intervalo entre as ordenhas, produção de leite e infecção da glândula mamária, podem interferir na composição do leite e, conseqüentemente, na do soro. (EMBRAPA, 2006). Apesar disso, observa-se na Tabela II.2, que para proteínas, os teores encontrados neste estudo estão próximos dos valores publicados pela USDA (2006), como também dos citados por SILVA *et al.* (2005). Já o valor de lipídeos está mais próximo do encontrado por SILVA *et al.* (2005).

Foi utilizado no experimento soro parcialmente desmineralizado, o que explica o teor de cinzas, que é inferior aos relatados na literatura consultada, obtido no presente trabalho.

2 Caracterização dos hidrolisados de soro de leite

2.1 Perfil peptídico dos hidrolisados protéicos

Conforme descrito anteriormente em diversos trabalhos realizados no mesmo laboratório do presente estudo, os hidrolisados protéicos foram separados em quatro frações (F1, F2, F3 e F4) (SILVESTRE *et al.*, 1994a, MORATO *et al.*, 2000, CARREIRA *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2005; DELVIVO *et al.*, 2006; DE MARCO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2006). A fração F1 corresponde aos peptídeos com mais de 7 resíduos de aminoácidos, a fração F2 aos

peptídeos médios contendo de 4 a 7 resíduos de aminoácidos, a fração F3 contém os di- e tripeptídeos e a fração F4 os aminoácidos livres. A título de exemplo, o perfil cromatográfico do hidrolisado S1, a 230nm, está apresentado na Figura II.1.

A técnica de SE-HPLC, utilizada no presente trabalho, foi eficiente na caracterização de hidrolisados protéicos, especialmente quando o interesse está voltado para o fracionamento de peptídeos de baixas massas moleculares, ou seja, inferiores a 1000Da.

Vários estudos realizados no mesmo laboratório do presente trabalho, utilizando o soro de leite (DE MARCO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; DELVIVO *et al.*, 2006) e outras fontes protéicas como caseína (MORATO *et al.*, 2000; CARREIRA *et al.*, 2004; MORAIS *et al.*, 2005; BARBOSA *et al.*, 2004), leite (LOPES *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2006) e arroz (BIZZOTTO *et al.*, 2006) confirmam estes resultados.

Técnicas como a eletroforese em gel de poliacrilamida-sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE) (SCHIMIDT & POLL, 1991; SCHIMIDT & MARKWIJK, 1993; GALLAGHER *et al.*, 1994) a cromatografia de exclusão molecular (SEC) (DEESLIE & CHERYAN 1991), a HPLC capilar (DAVIS & LEE, 1992), a HPLC de troca de iônica (AE-HPLC) (DIZDAROGLU, 1985) e a HPLC de exclusão molecular (SE-HPLC) empregando coluna TSK G-2000 SW (LEMIEUX *et al.*, 1991) e coluna Superose -12HR 10/30 (GOLOVCHENKO *et al.*, 1992; VISSER *et al.*, 1992) podem ser utilizadas para o fracionamento dos peptídeos de hidrolisados protéicos.

Entretanto, ao contrário da técnica aqui utilizada, a maioria destes métodos apresenta uma série de inconvenientes como, a dificuldade de separar os peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, sendo observada a superposição de compostos com pesos moleculares diferentes, relatada por LEMIEUX *et al.* (1991) empregando a SE-HPLC com uma coluna TSK G-2000 SW e DAVIS & LEE (1992) empregando a HPLC capilar. Além disso, empregando a SDS-PAGE, SCHIMIDT & POLL (1991), relataram a dificuldade de detectar pequenos peptídeos (<2000Da) pela técnica utilizada uma vez que os peptídeos, devido à fixação insuficiente, são removidos durante os procedimentos de revelação e lavagem do gel.

Também utilizando SE-HPLC, porém com uma coluna Superose-12HR 10/30, VISSER *et al.* (1992) e GOLOVCHENKO *et al.* (1992) verificaram a ocorrência de interações eletrostáticas e/ ou hidrofóbicas entre os solutos e a fase estacionária.

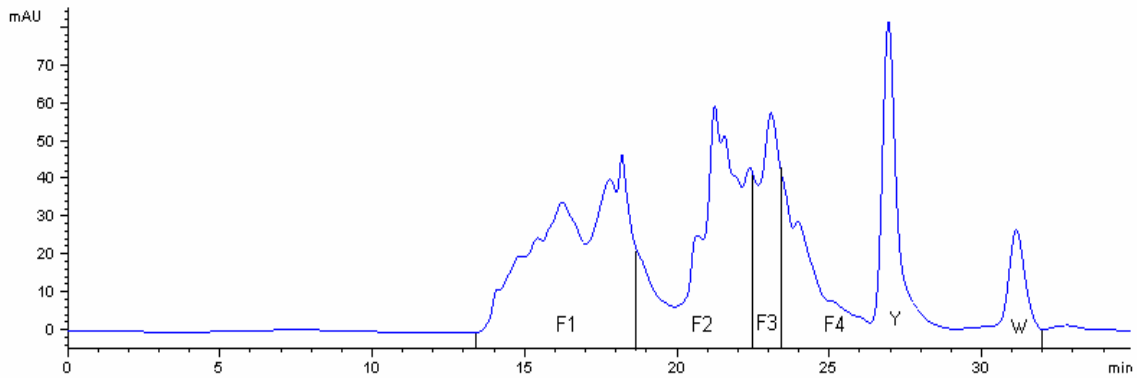


Figura II.1: Perfil cromatográfico do hidrolisado P1 a 230 nm.

F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Y = pico da tirosina, W = pico do triptofano. Hidrolisado P1= substrato a 10%; tempo de hidrólise = 5h; relação E:S = 1%.

2.2 Teor de peptídeos e aminoácidos livres dos hidrolisados

Observa-se na Tabela II.3 que, para 7 hidrolisados (P1, P2, P9, P10, P11, P12 e P14), a distribuição de peptídeos e de aminoácidos livres foi semelhante, uma vez que não foram observadas diferenças significativas para os valores das quatro frações cromatográficas.

O hidrolisado P6 apresentou o melhor perfil peptídico, uma vez que, apesar de seu teor de di- e tripeptídeos (12,42%) ter sido semelhante ao de outros hidrolisados, seu conteúdo de peptídeos com massa molecular média de 500Da (36,56%) foi o maior e o de aminoácidos livres (22,02%) o menor, dentre todas as amostras analisadas.

A ação da pancreatina sobre o perfil peptídico de hidrolisados de soro de leite foi, anteriormente, avaliada em dois estudos, no mesmo laboratório do presente trabalho, mas utilizando-se condições diferentes para o preparo dos hidrolisados e o emprego da enzima.

Assim, no primeiro estudo, a pancreatina foi imobilizada em carvão ativado, antes de se proceder a hidrólise do soro do leite. Em seguida, fez-se a caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados, cujo melhor resultado se mostrou inferior ao do hidrolisado P6 aqui obtido, com relação aos teores de grandes peptídeos (58%) e de peptídeos médios (25%) (SILVA *et al.*, 2005). A única vantagem da imobilização da pancreatina, em relação ao presente trabalho, refere-se ao baixo teor de aminoácidos livres (2%), já que o de di- e tripeptídeos foi semelhante (15%) ao do presente trabalho.

No segundo estudo, após a ação da pancreatina, os hidrolisados do soro de leite foram passados por uma coluna de carvão ativado e por uma membrana de

ultrafiltração (UF) (corte 1000Da) e, posteriormente, caracterizou-se o perfil peptídico. Os melhores resultados obtidos foram superiores aos do presente trabalho, especialmente com relação aos teores de di- e tripeptídeos (21%) e grandes peptídeos (16%) (DELVIVO *et al.*, 2006). Este fato pode ser explicado pela utilização da UF, porém esta técnica apresenta a desvantagem de encarecer o processo, dificultando a sua aplicação em larga escala. Além disso, foi utilizada no estudo uma concentração de substrato cerca de 10 vezes menor do que a empregada no presente trabalho (1,06%), o que eleva em demasia os custos do processo.

Tabela II.3 – Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados de soro de leite obtidos pela ação da pancreatina.

Hidrolisados	F1	F2	F3	F4
P1	22,44 ^{d/3}	26,26 ^{cde/2}	10,24 ^{abc/4}	41,04 ^{fg/1}
P2	23,34 ^{cd/3}	26,52 ^{cde/2}	10,45 ^{abc/4}	39,68 ^{g/1}
P3	8,69 ^{h/3}	21,51 ^{i/2}	8,26 ^{cd/3}	61,52 ^{a/1}
P4	19,55 ^{ef/3}	31,29 ^{b/2}	5,35 ^{e/4}	43,78 ^{e/1}
P5	18,71 ^{f/3}	23,78 ^{fgh/2}	10,10 ^{abc/4}	47,39 ^{d/1}
P6	28,93 ^{b/2}	36,56 ^{a/1}	12,42 ^{a/4}	22,02 ^{i/3}
P7	14,37 ^{g/3}	16,58 ^{j/2}	6,20 ^{de/4}	62,83 ^{a/1}
P8	31,48 ^{a/1}	28,05 ^{c/2}	9,67 ^{bc/3}	30,78 ^{h/1}
P9	21,65 ^{de/3}	27,68 ^{cd/2}	10,13 ^{abc/4}	40,53 ^{fg/1}
P10	23,85 ^{cd/3}	28,50 ^{c/2}	8,62 ^{c/4}	39,01 ^{g/1}
P11	23,15 ^{d/2}	24,83 ^{efg/2}	9,35 ^{bc/3}	42,64 ^{ef/1}
P12	22,12 ^{d/3}	25,47 ^{def/2}	10,20 ^{abc/4}	42,19 ^{ef/1}
P13	25,66 ^{c/2}	25,08 ^{ef/2}	5,11 ^{e/3}	44,13 ^{e/1}
P14	21,83 ^{de/3}	27,01 ^{cde/2}	11,34 ^{ab/4}	39,80 ^{g/1}
P15	15,01 ^{g/3}	22,62 ^{ghi/2}	9,61 ^{bc/4}	52,74 ^{c/1}
P16	15,29 ^{g/3}	21,80 ^{hi/2}	5,67 ^{e/4}	57,21 ^{b/1}
P17	19,10 ^{f/3}	26,71 ^{cde/2}	10,34 ^{abc/4}	43,84 ^{e/1}
P18	17,82 ^{f/3}	27,62 ^{cd/2}	10,44 ^{abc/4}	44,10 ^{e/1}

Todos os valores são apresentados em % nmols das quatro frações. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de significância na comparação de diferentes frações de um mesmo hidrolisado (linha). Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de significância na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados (coluna).

3. Comparação entre os diferentes tratamentos enzimáticos

Os resultados aqui obtidos serão comparados com os relatados na literatura para a ação da pancreatina sobre o perfil peptídico do soro de leite, porém, nesses estudos foram empregadas condições diferentes das utilizadas no presente trabalho no que se refere ao preparo dos hidrolisados e ao emprego da enzima.

Todos os parâmetros foram analisados levando-se em consideração a redução de custos do processo para adaptação em escala industrial. O aumento da concentração do substrato está associado à redução da quantidade de água e, conseqüentemente, do tempo gasto no processo de secagem; a redução da relação E:S está associada ao emprego de menor quantidade de enzima necessária para a hidrólise; a redução do tempo de hidrólise está relacionada à diminuição de contaminação bacteriana, à redução de formação de produtos de degradação, além de menor consumo de energia.

3.1.1 Efeito da concentração do substrato

Para analisar o efeito da concentração inicial do soro de leite sobre o perfil peptídico dos hidrolisados protéicos, devem ser comparados os seguintes hidrolisados: P1 com P10, P2 com P11, P3 com P12, P4 com P13, P5 com P14, P6 com P15, P7 com P16, P8 com P17 e P9 com P18, uma vez que os parâmetros tempo de hidrólise, relação E:S, pH e temperatura são mantidos constantes. Em cada uma das partes A, B e C da Figura II.2, estão apresentados três destes grupos.

Observa-se na Figura II.2 que a vantagem da utilização de uma maior concentração do substrato ocorreu em alguns casos e relaciona-se a elevação do teor de oligopeptídeos (P3 e P12; P5 e P14; P7 e P16) e a queda nos teores de grandes peptídeos (P6 e P15; P8 e P17; P9 e P18) e de aminoácidos livres (P3 e P12; P5 e P14; P7 e P16) ao aumentar a concentração de 10% para 15%.

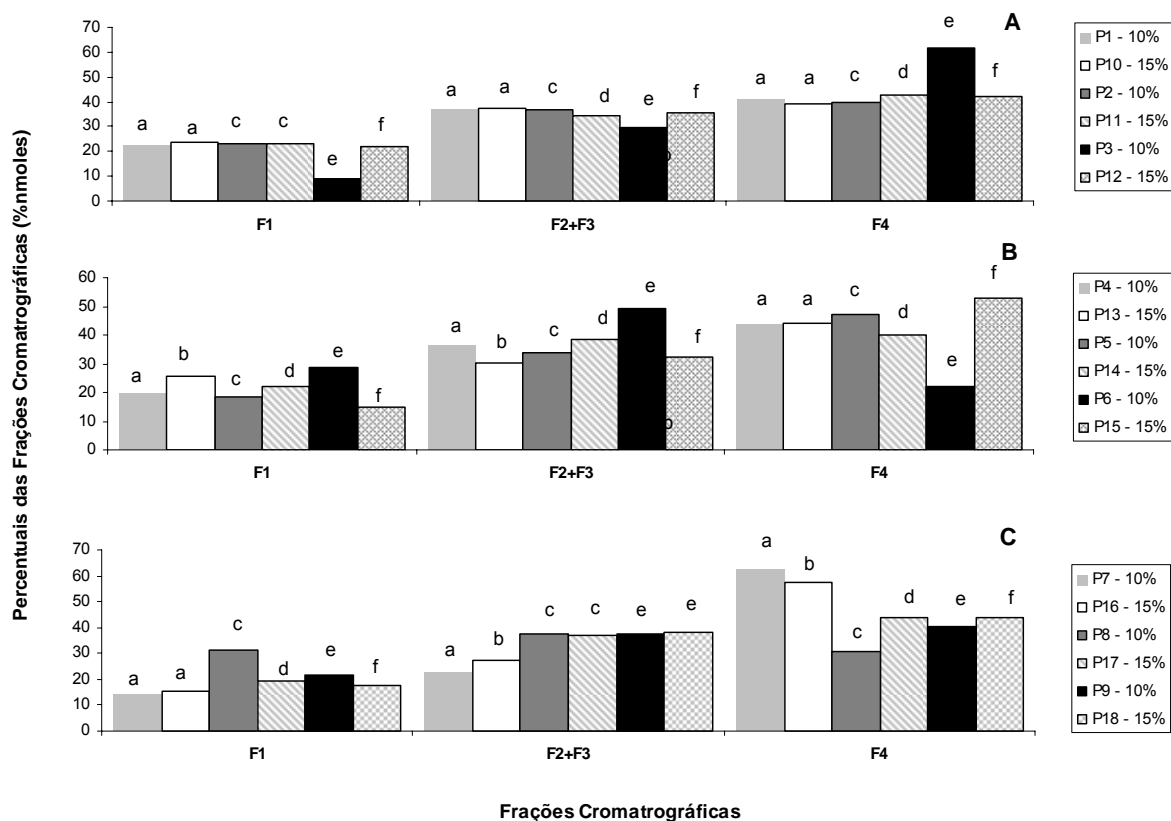


Figura II.2: Efeito da concentração do substrato sobre o perfil peptídico de hidrolisados de soro de leite. Concentrações utilizadas: 10% (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9) e 15% (P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18). F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2+F3: oligopeptídeos (2 a 7 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

3.1.2 Efeito da relação E:S

A influência da relação E:S na ação da pancreatina sobre o soro de leite pode ser avaliada na Figura II.3. No intuito de manter os demais parâmetros hidrolíticos constantes, a análise dos dados deve considerar seis grupos contendo, cada um, três hidrolisados: grupo 1 (P1, P2 e P3); grupo 2 (P4, P5 e P6); grupo 3 (P7, P8 e P9); grupo 4 (P10, P11 e P12); grupo 5 (P13, P14 e P15) e grupo 6 (P16, P17 e P18). Em cada uma das partes A, B e C da Figura II.3, estão apresentados dois destes grupos.

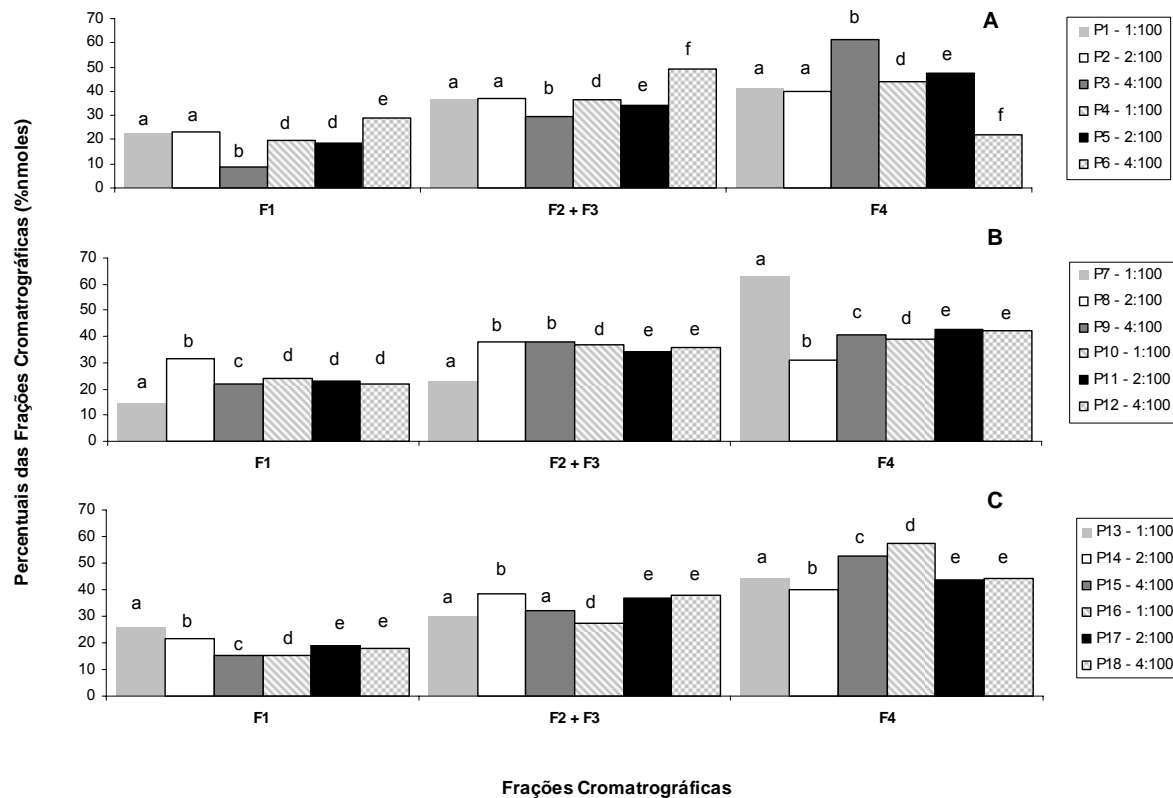


Figura II.3: Efeito da relação E:S sobre o perfil peptídico de hidrolisados de soro de leite. Relações E:S utilizadas: 1:100 (P1, P4, P7, P10, P13, P16), 2:100 (P2, P5, P8, P11, P14, P17) e 4:100 (P3, P6, P9, P12, P15, P18) F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2+F3: oligopeptídeos (2 a 7 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

Observa-se que o efeito benéfico devido à utilização de uma menor relação E:S ocorreu em dois casos relacionados com a elevação do teor de oligopeptídeos quando a E:S passou de 4:100 para 2:100 (P3 e P2; P15 e P14). e, em dois casos, ao passar de 2:100 para 1:100 (P5 e P4; P11 e P10) Além disso, a redução do teor de grandes peptídeos foi obtida em apenas um caso, quando passou de 4:100 para 2:100 (P6 e P5), e em dois casos quando a relação E:S passou de 2:100 para 1:100 (P8 e P7; P17 e P16). Os menores teores de aminoácidos livres foram obtidos em três casos quando a E:S caiu de 4:100 para 2:100 (P3 e P2; P9 e P8; P15 e P14) e em dois casos quando a E:S foi reduzida de 2:100 para 1:100 (P5 e P4; P11 e P10).

Em dois estudos anteriores realizados no mesmo laboratório do presente trabalho, empregando-se a pancreatina para hidrolisar o soro de leite, o efeito da redução da relação E:S sobre o perfil peptídico foi avaliado após o tratamento dos hidrolisados com carvão ativado para remoção de fenilalanina.

Assim, empregando-se esta enzima imobilizada em carvão ativado, observou-se que a utilização de uma relação E:S 100 vezes menor (de 1:100 para 0,01:100) foi benéfica para o perfil peptídico, tendo aumentado substancialmente o teor de oligopeptídeos (de 8% para 40%) e reduzido drasticamente o conteúdo de aminoácidos livres (de 53% para 2%) (SILVA *et al.*,2005). No segundo estudo, a pancreatina foi usada em solução, e não foi observado qualquer efeito sobre o perfil peptídico, relacionado à utilização de uma menor relação E:S de 0,1:100 para 0,01:100 (DELVIVO *et al.*, 2006).

3.1.3 Efeito do tempo de hidrólise

A influência do tempo na ação da pancreatina sobre o soro de leite pode ser avaliada na Figura II.4. No intuito de manter os demais parâmetros hidrolíticos constantes, a análise dos dados deve considerar seis grupos contendo, cada um, três hidrolisados: grupo 1 (P1,P4 e P7); grupo 2 (P2, P5 e P8); grupo 3 (P3, P6 e P9); grupo 4 (P10, P13 e P16) grupo 5 (P11, P14 e P17) e grupo 6 (P12, P15 e P18). Em cada uma das partes A, B e C da Figura II.4, estão apresentados dois destes grupos.

Observa-se que o efeito benéfico devido à utilização de um menor tempo de reação, associado com a elevação do teor de oligopeptídeos, ocorreu em três casos relacionados quando o tempo passou de 15h para 10h (P7 e P4; P9 e P6; P16 e P13) e, em outros três , ao passar de 10h para 5h (P5 e P2; P13 e P10; p15 e p12). Além disso, a redução do teor de grandes peptídeos foi obtida em dois casos quando o tempo passou de 15h para 10h (P8 e P5; P18 e P15) e, em um caso, quando passou de 10h para 5h (P6 e P3). Os menores teores de aminoácidos livres foram obtidos em quatro casos quando o tempo foi reduzido de 15h para 10h (P7 e P4; P9 e P6; P16 e P13; P17 e P14) e, em quatro casos, quando o tempo foi reduzido de 10h para 15h (P4 e P1; P5 e P2; P13 e P10; P15 e P12).

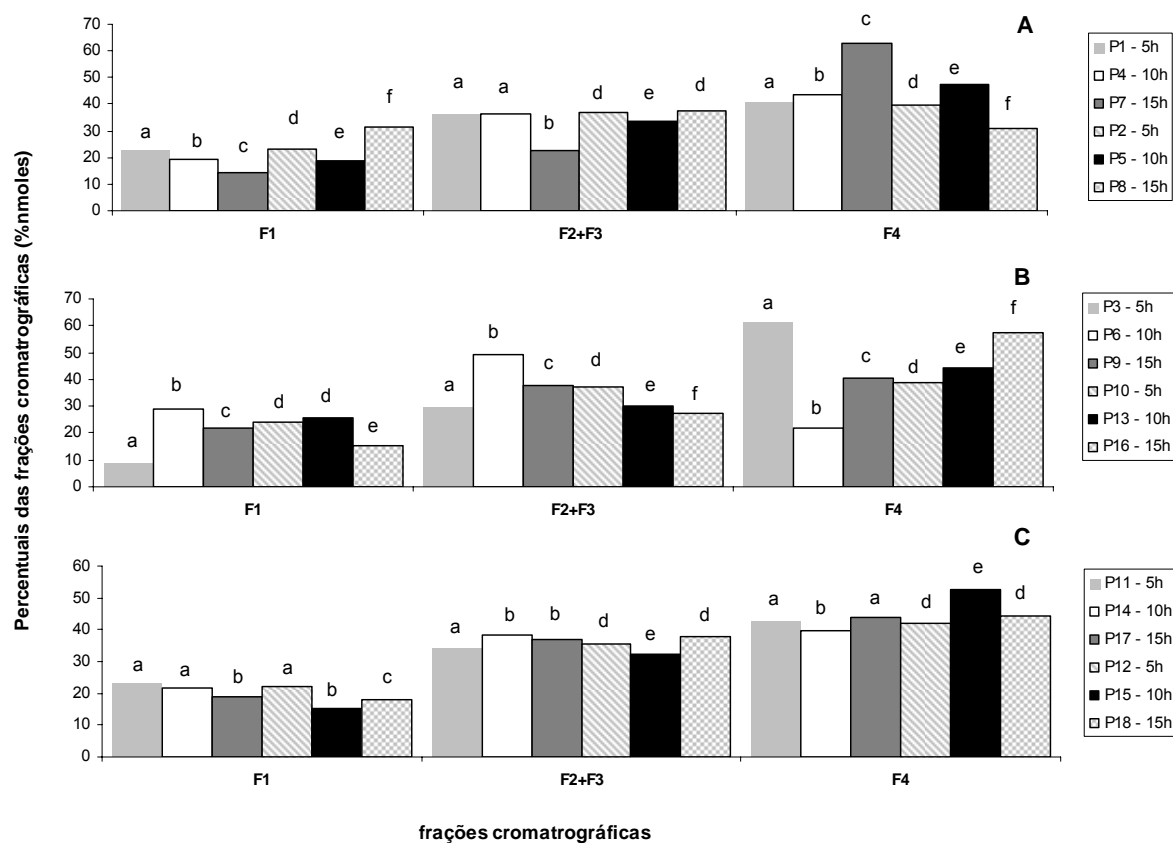


Figura II.4: Efeito do tempo de hidrólise sobre o perfil peptídico de hidrolisados de soro de leite. Tempos utilizados: 5h (P1, P2, P3, P10, P11, P12), 10h (P4, P5, P6, P13, P14, P15) e 15h (P7, P8, P9, P16, P17, P18). F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2+F3: oligopeptídeos (2 a 7 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

CONCLUSÃO

A ação da pancreatina foi eficiente na produção de hidrolisados de soro de leite com perfil peptídico adequado para uso em dietas especiais. Dentre as condições testadas, a que empregou a concentração do substrato de 10%, a relação E:S de 4:100 e o tempo de hidrólise de 10h, propiciou o melhor resultado, tendo alcançado um teor de oligopeptídeos de 49%. O efeito benéfico, associando os diversos parâmetros estudados (utilização de maior concentração do substrato e de menores relação E:S e tempo de reação), com a redução dos custos de processo, foi observado em vários casos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) *Official methods of analysis of AOAC international*. 16 ed. Arlington: AOAC International, 1995. 2v.
- BARBOSA, C.M.S.; MORAIS, H.A.; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres, *J. Sci. Food Agric.*, v. 84, n. 14, p. 1891-1900, 2004.
- BIZZOTTO, C.S.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, V.D.M.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da corolase pp e uso do carvão ativado. *Rev. Ciênc. Agrotecnol.*, v. 30, n. 2, p. 308-316, 2006.
- BOZA, J. J.; MOËNNOZ, D.; VUICHLOUD, J.; JARRET, A. R.; GAUDARD-DE-WECK, D.; BALLÈVRE, O. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur. J. Nutr.*, v. 39, p. 237-243, 2000.
- CARREIRA, R.L.; DE MARCO, L.M.; DIAS, D.R.; MORAIS, H.A.; SILVESTRE, M.P.C. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. *Acta Farm. Bon.*, v. 23, n. 1, p. 17-25, 2004.
- CHERYAN, M. *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. Illinois: Technomic Publishing Co, 1998, 527p.
- DAVIS, M.T.; LEE, T. D. Analysis of peptide mixtures by capillary high performance liquid chromatography: A practical guide to small-scale separations. *Prot. Sci*, v.1, p.935-944, 1992.
- DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Uso do carvão ativado para remoção de fenilalanina de hidrolisados protéicos, obtidos pela ação da papaína imobilizada. *Braz. J. Food Technol.*, v. 8, n. 3, p. 210-219, 2005.
- DELVIVO, F.M.; VIEIRA, C.R.; BIASUTTI, E.A.R.; AFONSO, W.O.; SILVESTRE, M.P.C. Evaluating the effect of adsorption medium, hydrolytic parameters and ultrafiltration on the phenylalanine removal from pancreatic whey hydrolysates. *Am. J. Food Technol.*, v. 1, n. 2, p. 94-104, 2006.

- DEESLIE, W.D; CHERYAN, M. Fractionation of soy protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *J. Agric. Food Sci.*, v. 57, n. 2, p. 26 - 31, 1991.
- DIZDAROGLU, M. Weak anion-exchange high-performance liquid chromatography of peptides. *J. Chromatog.*, v. 334, p. 49-69, 1985.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Agência de informação - Agronegócio do leite. Disponível em:< http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html>. Acessado em: 20 set. 2006.
- GALLAGHER, J.; KANEKANIAN, A.D.; EVANS E.P. Hydrolysis of casein: a comparative study of two proteases and their peptide maps. *Int. J. Food Sci. Tech.*, v.29, p. 279-285, 1994.
- GAUTHIER, S.F. & POULIOT, Y. Functional and biological properties obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, v.86, p.78-87, 2003.
- GOLOVCHENKO, N, KATAEVA, I. A, AKIMENKO, V. K. Analysis of pH-dependent protein interactions with gel filtration medium. *J. Chromatogr.*, v. 591, n. 4, p.121-128, 1992.
- GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSKI Jr., M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v. 71, n. 1, p. 65-9, 1986.
- KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R. C. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut.*, v. 26, p .907 - 913, 1985.
- LEMIEUX, L.; PIOT, J.M., GUILLOCHON, D; AMIOT, J. Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *J. Chromatogr.*,v. 32, p.499-504, 1991.
- LOOSEN, P.C.; BRESSPOLLIER, P. R.; JULIEEN, A. R.; PEJOAN, C. H.; VERNEUIL, B. *Procedé pour préparer um hydrolysat enzymatique*. Tessengerlo Cheemie n. v. [BE/BE]; Stationsstraat, B-3980 Tessengerlo (BE). A23J3/34, C12P21/06 C12S3/14, C07K15/00//A61K37/18, A23J3/04, 3/14. FR-PCT/BE91/00001, W091/10369. 11/01/1991; 25/07/1991.

- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C. Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. *Brit. Food J.*, v. 107, n. 1, p. 42-53, 2005.
- MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 69, p. 1163 - 1169, 1992.
- MORAIS, H.A.; DE MARCO, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alim.*, v. 34, n. 1, p. 59-69, 2005.
- MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J. Food Comp. and Anal.*, v.13, p.843-857, 2000.
- NIELSEN S.S. *Food Analysis*. Gaithersburg: Aspen Publisher, 1998. 630 p.
- PACHECO, M.T.B; DIAS N.F.G; BALDINI, V.L; TANIKAWA, C & SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos do soro de leite. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.25, n.2, p.333-338, 2005.
- PEARCE, R.J. Food functionality success or failure for dairy based ingredients. *Aust. J. Dairy Technol.*, v. 50, n. 1, p. 15-23, 1995.
- PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci Technol.*, v.11, p.347-356, 2001.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 14 ed. Piracicaba, 2000. 477p.
- RERAT, A. A. Nutritional supply of proteins and absorption of their hydrolysis products: consequences on metabolism *Pro. Nutr. Soc.*, v. 52, p. 335-344, 1993.
- SCHMIDT, D.G.; MARKWIJK, B.W.V. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Influence of heat treatment of α -lactalbumin and β - lactoglobulin on their proteolysis by pepsin and papain. *Neth. Milk Dairy J.*, v. 47, p.15-22, 1993
- SCHMIDT, D.G, POLL, J.K. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Neth. Milk Dairy J.*, v. 45, n. 4, p. 225-240, 1991.

- SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Rev. Nutr.*, v. 17, no.4, p. 397-409, 2004.
- SGARBIERI, V. C. *Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações*. São Paulo: Varela, 1996. 517p.
- SILVA, V.D.M.; DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; AGUIAR, M. Jb; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego da pancreatina imobilizada no preparo de hidrolisados de soro de leite com teor reduzido de fenilalanina. *Alim. Nutr.*, v. 16, n. 1, p. 21-31, 2005.
- SILVESTRE, M. P. C., HAMON, M.; YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, n. 12, p. 2778-2782, 1994a.
- SILVESTRE, M. P. C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J. Agric. Food Chem.*, v.42, n.12, p.2783-2789, 1994b.
- SISO M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Biores. Technol.*, v. 57, p. 1-11, 1996.
- SOARES, R.D.L.; BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C.R.; SILVA, V.D.M.; JANUÁRIO, J.N. ; AGUIAR, M.JB. ; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farm. Bon.*, v. 25, n. 3, p. 325-332, 2006.
- USDA (United States Department of Agriculture). Nutrient Data Laboratory. Disponível em:<<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>> acesso em 24/11/2006.
- USDEC News Ingredients. Versatilidade dos ingredientes lácteos, v. 4, n. 4, São Paulo, 2002.
- VIJAYALAKSHIMI, M.A.; LEMIEUX, L.; AMIOT, J. High performance size exclusion liquid chromatography of small molecular weight peptides from protein hydrolysates using methanol as a mobile phase additive. *J. Liq. Chromatogr.*, v. 9, p. 3559-3576, 1986.
- VISSER, S., SLAGEN, C. J., ROBBEN, A. J. P. M. Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr.*, v. 599, p. 205 - 209, 1992.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As condições hidrolíticas testadas neste estudo foram eficientes na obtenção de hidrolisados de soro de leite, ricos em oligopeptídeos e com baixo teor de grandes peptídeos e aminoácidos livres, empregando-se a subtilisina e pancreatina.

Dentre os parâmetros testados, o efeito benéfico do aumento da concentração do substrato e das reduções da relação E:S e do tempo de reação, levando a um maior teor de oligopeptídeos, foi observado em vários casos. Além disso, a seleção do melhor hidrolisado levou em consideração a redução de custos do processo para adaptação em escala industrial. Neste sentido, é importante ressaltar que: o aumento da concentração do substrato está associado à redução da quantidade de água e, conseqüentemente, do tempo gasto no processo de secagem; a redução da relação E:S está associada ao emprego de menor quantidade de enzima necessária para a hidrólise; a redução do tempo de hidrólise está relacionada à diminuição de contaminação bacteriana, à redução de formação de produtos de degradação, além de menor consumo de energia.

Assim, utilizando-se a subtilisina, o melhor perfil peptídico foi obtido ao se empregar 15% de substrato, E:S de 1:100 e 5h de reação, obtendo-se um teor de oligopeptídeos de 41,42%. Já, para a pancreatina, a concentração do substrato de 10%, a relação E:S de 4:100 e o tempo de reação de 10h propiciou o melhor resultado, tendo alcançado um teor de oligopeptídeos de 49,00%.

Os melhores resultados dos hidrolisados obtidos pela ação da subtilisina (S10) e da pancreatina (P6) foram comparados. Observa-se que a utilização da pancreatina foi mais vantajosa uma vez que deu origem a um hidrolisado contendo elevado teor de oligopeptídeos (49%) e baixo teor de grandes peptídeos (28,93%), enquanto que a utilização da subtilisina destaca-se pelo seu baixo conteúdo de aminoácidos livres (15,37%).

Dando continuidade a este estudo seria interessante a avaliação do teor de aminoácidos, a fim de complementar a caracterização dos hidrolisados, possibilitando assim uma visão mais precisa do valor nutricional destas preparações. Além disso, propõe-se a realização de testes piloto a fim de ajustar as condições para produção em larga escala.

Considerando-se os resultados aqui obtidos, sugere-se o estudo da utilização de outras enzimas de diversas origens (animal, vegetal ou microorganismos) na busca de hidrolisados protéicos com elevados teores de oligopeptídeos. Da mesma forma,

outras fontes protéicas poderiam ser utilizadas como matéria-prima. Nesse caso, torna-se importante avaliar economicamente a escolha do substrato. Em todos estes casos, diferentes parâmetros hidrolíticos devem ser, igualmente, testados.

Os hidrolisados de soro de leite poderiam ser utilizados como fonte protéica na elaboração de suplementos alimentares para os diversos casos de nutrição clínica, bem como no desenvolvimento de outros alimentos, por exemplo, bebidas lácteas, apresentando como vantagem, além do enriquecimento do teor protéico, a melhor absorção das proteínas.

Propõem-se também, o estudo das propriedades bioativas destes hidrolisados em modelos animais, assim como foi feito com os hidrolisados de arroz desenvolvidos no mesmo laboratório do presente trabalho, que foram testados na redução da translocação bacteriana em ratos, obtendo-se resultados positivos.

Finalmente, propõe-se o estudo das propriedades funcionais destes hidrolisados (capacidade emulsionante, solubilidade, formação de espuma, geleificação etc), visando seu emprego em diversos produtos alimentícios.

OUTRAS PUBLICAÇÕES

ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS ESPECIALIZADOS

BIASUTTI, E.A.R.; VIEIRA, C.R.; CAPOBIANGO, M.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Study of some functional properties of casein: effect of pH and tryptic hydrolysis. *Inter. J. Food Prop.*, 2006. (No prelo).

BIASUTTI, E. A.R.; DE MARCO, L.M.; VIEIRA, C.R.; SILVA, V.D.M.; MORAIS, H.A.; SILVESTRE, M.P.C. Evaluation of some parameters for immobilizing papain on activated carbon and alumina. *Pakistan J. Nutr.*, 2006. (No prelo).

BIZZOTTO, C.S.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, V.D.M.; AZEVEDO, K.V.; JUNQUEIRA, R. G. SILVESTRE, M.P.C. Uso da pancreatina e do carvão ativado no preparo de

hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina *Tecno-Lógica*, v. 10, p. 9-30, 2006.

BIZZOTTO, C.S.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, V.D.M.; JUNQUEIRA, R. G.; SILVESTRE, M.P.C. Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da corolase pp e uso do carvão ativado. *Rev. Ciênc. Agrotecnol.*, v. 30, n. 2, p. 308-316, 2006.

CAPOBIANGO, Michely ; BIZZOTTO, Carolina Shaper ; BIASUTTI, Eliza Augusta Rolim ; SILVESTRE, M. P. C. Action of Pepsin on Emulsifying Properties of Globin. *Inter. J.Food Prop.*, v. 9, n. 2, p. 357-364, 2006.

DELVIVO, F.M.; VIEIRA, C.R.; BIASUTTI, E.A.R.; AFONSO, W.O.; SILVESTRE, M.P.C. Evaluating the effect of adsorption medium, hydrolytic parameters and ultrafiltration on the phenylalanine removal from pancreatic whey hydrolysates. *Ame. J. Food Technol.*, v. 1, n. 2, p. 94-104, 2006.

VIEIRA, C.R; BIASUTTI, E.A.R; CAPOBIANGO, M. AFONSO, W.O.; SILVESTRE, M.P.C. Effect of salt on the solubility and emulsifying properties of casein and its tryptic hydrolysates. *Ars Pharm.*, 2006. (No prelo).

SOARES, R. D.L.; BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C. R.; SILVA, V.D.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M. Jb; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farm. Bom.*, v. 25, n. 3, p. 325-332, 2006.

SOARES, R.D.L.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVESTRE, M.P.C. Enzyme-catalyzed production of oligopeptides from skim milk. *Food Biotech.*, n. 1, 2006. (No prelo).

RESUMOS DE ARTIGOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS E SIMPÓSIOS

CAPOBIANGO, M.; CARREIRA, R.L.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVESTRE, M.P.C. Preparo de concentrados protéicos de fubá de milho empregando-se álcool e álcali, simultânea ou seqüencialmente. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 6, 2005, Campinas. [Resumos] Campinas: Unicamp, 2005. 1 CD-ROM.

SILVA, V.D.M.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, A.L.S.; SILVESTRE, M.P.C. Avaliação de algumas condições de imobilização da pancreatina em alumina. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 6, 2005, Campinas. [Resumos] Campinas: Unicamp, 2005. 1 CD-ROM.

BIASUTTI, E.A.R.; CAMPOS, R.B.D.; LARA, S.R.; AFONSO, W.O.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Otimização das condições da hidrólise enzimática do soro do leite para obter elevado teor de oligopeptídeos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 20, 2006, Curitiba. [Resumos] Curitiba: SBCTA/PR, 2006.

CARREIRA, R.L.; BIASUTTI, E.A.R.; AZEVEDO, K.V.; ARAÚJO, G.M.M.; RAMOS, C. S.; SILVESTRE, M.P.C. Extração química e enzimática das proteínas da farinha de trigo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 20, 2006, Curitiba. [Resumos] Curitiba: SBCTA/PR, 2006.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERT, T.; KNEIFEL, W. Physicochemical and functional properties of casein hydrolysates obtained by treatment with different enzymes. In: IDF (Inter. Dairy Fed.) *Sem. Prot. Fat glob modif.*, p. 97 - 105, 1993.
- ADLER-NISSEN, J. Procesamiento enzimático de las proteínas alimenticias. *Alimentos*, v. 6, p. 29 - 33, 1981.
- ALMEIDA, K. E BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo Minas Frescal. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 21(2), p.187-192, 2001.
- AMIOT, J.; BRISSON, G. J. Continuous automatic nitrogen determination for gel chromatography of protein enzymatic hydrolysates. *J. Chromatogr.*, v.193, p.496 - 499, 1980.
- ANANTHARAMAN, K.; FINOT, P.A. Nutritional aspects of food proteins in relation to technology. *Food Rev. Int.*, v. 9, p. 629 – 655, 1993.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) Official methods of analysis of AOAC international. 16 ed. Arlington: AOAC International, 1995. 2v.
- AUBES-DUFAU, I., SERIS, J-L., COMBES, D. Production of peptic hemoglobin hydrolysates: bitterness demonstration and characterization. *J. Agric. Food Chem.*, v.43, n. 8, p.1982-1988, 1995.
- BARBOSA, C.M.S.; MORAIS, H.A.; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres, *J. Sci. Food Agric.*, v. 84, n. 14, p. 1891-1900, 2004.
- BIZZOTTO, C.S.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, V.D.M.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da corolase pp e uso do carvão ativado. *Rev. Ciênc. Agrotecnol.*, v. 30, n. 2, p. 308-316, 2006.
- BOZA, J.J.; MARTINEZ-AUGUSTIN, O.; GIP, A. Nutritional and antigenic characterization of an enzymatic whey protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.*, v. 43, p. 872-875, 1995.

- BOZA, J. J.; MOËNNOZ, D.; VUICHOUD, J.; JARRET, A. R.; GAUDARD-DE-WECK, D. O. Ballèvre Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur. J. Nutr.*, v. 39, p. 237-243, 2000.
- BEYNON, R.J.; BOND, J.S. *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*, New York: Oxford University Press, 1989. 278p.
- CÂNDIDO, L.M.B. *Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de tilápia do Nilo (Oreochromus niloticus): composição, propriedades nutritivas e funcionais*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, 1998. 207f. (Tese de Doutorado).
- CAPITANI, C.D.; PACHECO, M.T.B.; GUMERATO, H.F.; VITALI, A.; SCHMIDT, F.L. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.40, n.11, p.1123-1128, 2005.
- CAPOBIANGO, M.; BIZZOTTO, C. S. ; BIASUTTI, E.A.R.; SILVESTRE, M.P.C. Action of Pepsin on Emulsifying Properties of Globin. *Inter. J. Food Prop.*, v. 9, n. 2, p. 357-364, 2006.
- CARREIRA, R.L.; MARCO, L.M.; DIAS, D.R.; MORAIS, H.A.; SILVESTRE, M.P.C. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. *Acta Farm. Bon.*, v. 23, n. 1, p. 17-25, 2004.
- CHERYAN, M. *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. Illinois: Technomic Publishing Co, 1998, 527p.
- CHATAUD, J, DESREUMEUX, S, CARTWRIGHT, T, Procédé de fabrication d'un hydrolysat 0enzymatique de protéines riche en di- et tri-peptides, utilisable notamment en nutrition artificielle et en diététique. Laboratório Roger Bellon, Neuilly-sur-Seine-FR. A23J3/00. FR87402837.6, 0.274946A1. 14/12/1987, 20/07/1988
- CHEFTEL J. C., CUQ J. L.; LORIENTE, D. *Proteínas alimentarias-bioquímicas-propiedades funcionales-valor nutricional-modificaciones químicas*. Acribia, Zaragoza, 1989, 345p.
- CHERYAN, M. *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. Illinois: Technomic Publishing Co, 1998, 527p.
- CHOBERT, J-M, SITOHY, M. Z, WHITAKER, J. R. Solubility and emulsifying properties of caseins modified enzymatically by Staphylococcus aureus V8 protease. *J. Agric. Food Chem.*, v. 36, n. 1, p. 220-224, 1988a.

- CHOBERT, J-M.; BERTRAND-HARD, C.; NICOLAS, M-G. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *J. Agric. Food Chem.*, v. 36, n. 5, p. 883 – 892, 1988b.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 11, n. 7, p. 254 - 262, 2000.
- DAVIS, M; LEE, T. D. Analysis of peptide mixtures by capillary high performance liquid chromatography: a practical guide to small-scale separations. *Prot. Sci*, v.1, p.935-944, 1992.
- DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Uso do carvão ativado para remoção de fenilalanina de hidrolisados protéicos, obtidos pela ação da papaína imobilizada. *Braz. J. Food Technol.*, v. 8, n. 3, p. 210-219, 2005.
- DEESLIE, W.D, CHERYAN, M. Continuous enzymatic modification of proteins in an ultrafiltration reactor. *J. Food. Sci.*, v.46, p.1035-1046, 1981.
- DEESLIE, W.D, CHERYAN, M. Fractionation of soy protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *J. Food. Sci.*, v.57, n.2, p.411-413, 1991.
- DELVIVO, F.M.; VIEIRA, C.R.; BIASUTTI, E.A.R.; AFONSO, W.O.; SILVESTRE, M.P.C. Evaluating the effect of adsorption medium, hydrolytic parameters and ultrafiltration on the phenylalanine removal from pancreatic whey hydrolysates. *Am. J. Food Technol.*, v. 1, n. 2, p. 94-104, 2006.
- DINIZ, F.M. & MARTIN, A.M. Hidrolisado protéico de pescado In: OGAWA, M. & MAIA, E.L. *Manual de Pesca*. São Paulo: Varela, 1999.
- DIZDAROGLU, M. Weak anion-exchange high-performance liquid chromatography of peptides. *J. Chromatogr.*, v. 334, p.49 - 69, 1985.
- DUARTE, A. J.; CARREIRA, R. L; JUNQUEIRA, R. G.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Propriedades emulsionantes e solubilidade da caseína bovina e de seus hidrolisados tripticos: 2. efeito da adição de NaCl. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 18, n.3, p.302-308, 1998.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Agência de informação - Agronegócio do leite. Disponível em:< http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html>. Acesso em: 20 set. 2006.

- FRENHANI, P.B.; BURINI, R.B. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. *Arq. Gastroenterol.*, v. 36, n. 4, p. 227-237, 1999.
- FREITAS, O.; PADOVAN, G.J.; VILELA, L.; SANTOS, J.E.; OLIVEIRA, J.E.D.; GREENE, L.J. Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition. *J. Agric. Food Chem.*, v. 41, p. 1432 - 1438, 1993.
- FRØKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technol.*, v. 48, n.10, p. 86-88, 1994.
- FURLAN, E. F.; OETTERER, M. Hidrolisado Protéico de Pescado. *Rev. Ciên. Tecnol.*, v. 10, n 19, p. 79-89, 2002.
- FURST, P.; ALBERS, S.; STEHLE, P. Dipeptides in clinical nutrition. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 49, n. 3, p. 343-359, 1990.
- GALLAGHER, J.; KANEKANIAN, A.D.; EVANS E.P. Hydrolysis of casein: a comparative study of two proteases and their peptide maps. *Int. J. Food Sci. Tech.*, v.29, p. 279-285, 1994.
- GAUTHIER, S.F. & POULIOT, Y. Functional and biological properties obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, v.86, p.78-87, 2003.
- GAUTHIER, S. F.; VACHON, C.; SAVOIE, L. Enzymatic conditions of an *in vitro* method to study protein digestion. *J. Food Sci.*, v. 51, n. 3, p.960-964, 1986.
- GOLOVCHENKO, N, KATAEVA, I. A, AKIMENKO, V. K. Analysis of pH-dependent protein interactions with gel filtration medium. *J. Chromatogr, Amsterdam*, v.591,n.4, p.121-128, 1992.
- GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M. P.; GUADIX, E. M.. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular - weight range. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 44, n. 4, p. 529-532, 1994.
- GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSKI, M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acids and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v. 71, p. 65 - 69, 1986.
- GRIMBLE, G.K.; SILK, D.B.A. Peptides in human nutrition. *Nutr. Research Rev.*, v. 2, p. 87-108, 1989.

- HA, E. & ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (Review) *J. Nut. Biochem.*, v.14, p. 251-258, 2003.
- HAQUE, Z.U.; MOZAFFAR, Z. Casein hydrolysate. II. Functional properties of peptides. *Food Hydrocoll.*, v. 5, n. 6, p. 559-71, 1992.
- HARTSUNCK, J.A.; LIPSCOMB, W.N. Carboxypeptidase A. In: BOYER, P.D. *The enzymes*. 3 ed. New York: Academic Press, 1971, p. 1 – 55.
- HESS, G.P. Chymotrypsin – chemical properties and catalysis. In: BOYER, P.D. *The enzymes*. 3 ed. New York: Academic Press, 1971, p. 213 – 245.
- HINSBERGER, A. & SANDHU, B.K. Digestion and absorption *Cur. Paed.*, v. 14, p. 605-611, 2004.
- HARAGUCHI, F.K.; ABREU W.C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Rev. Nutr.*, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.
- ILIEV, I.; TCHORBANOV, B. Determination of tryptophan in protein hydrolysates and fermentation media using gel chromatography. *Biotechnol. Applied Biochem.*, v.16, p.29-33, 1992.
- KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R. C. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut.*, v. 26, p .907 - 913, 1985.
- KILARA, A. Enzyme-modified protein food ingredients, *Proc. Biochem.* p.149-157, 1985.
- KINSELLA, J.E. & WHITEHEAD, D. M. Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. *Adv. Food Nutr Res.*, v.33, p.343-437, 1989.
- KITAGAWA, T.; OWADA, M.; AOKI, K.; ARAI, S.; OURA, T.; MATSUDA, I.; IGARASHI, Y.; TADA, K.; KATAYAMA, S.; HASHIDA, W. Treatment of phenylketonuria with a formula consisting of low - phenylalanine peptide. *Enz.*, v. 38, p. 321 - 327, 1987.
- KORHONEN H, MARNILA P, Gill HS (2000) Milk immunoglobulins and complement factors. *Brit. J. Nut.*, v. 84, p. 75-80.
- LAHL, W.J.; BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.*, v. 48, p. 68 – 67, 1994.

- LANDRY, J.; DELHAYE, S.; VIROGBEN, G. Tryptophan content of feedstuffs as determined from three procedures using chromatography of barytic hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, v. 36, p. 51 - 52, 1988.
- LEMIEUX, L.; PIOT, J. M. Efficiency of five chromatographic systems for separation of casein digest. *J. Liquid Chromatogr.*, v.13, n. 20, p. 4023-4035, 1990.
- LEMIEUX, L.; PIOT, J. M., GUILLOCHON, D; AMIOT, J. Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *J. Chromatogr.*, v. 32, p. 499 - 504, 1991.
- LOOSEN, P.C.; BRESSPOLLIER, P. R.; JULIEEN, A. R.; PEJOAN, C. H.; VERNEUIL B. Procède pour preparer um hydrolysat enzymatique. Tessenderlo Cheemie n. v. [BE/BE]; Stationsstraat, B-3980 Tessenderlo (BE). A23J3/34, C12P21/06 C12S3/14, C07K15/00//A61K37/18, A23J3/04, 3/14. FR-PCT/BE91/00001, W091/10369. 11/01/1991; 25/07/1991.
- LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C. Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. *Brit. Food J.*, v. 107, n. 1, p. 42-53, 2005.
- MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *J. Am. Oil Chem.Soc.*, v. 69, p. 1163 - 1169, 1992.
- MARKLAND, F. S, SMITH, E. L. Subtilisins: primary structure, chemical and physical properties. In: BOYER, P. D. *The enzymes*. 3. ed. New York:Academic Press, 1971, Vol:III -Hydrolysis: peptide bonds, p.561-607.
- MINAGAWA, E.; KAMINOGAWA, S.; TSUKASAKI, F.; YAMAUCHI. K. Debittering mechanism in bitter peptides of enzymatic hydrolysates from milk casein by aminopeptidase T. *J. Food Sci.*, v.54, p.1225-1229, 1989.
- MIRA, N.V.M. e MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. Saúde Pub.* v. 34, n. 1, p . 86 - 96, 2000.
- MORAIS, H.A.; BARBOSA, C.M.S.; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S. ; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Comparative study of microencapsulation of casein hydrolysates in lipospheres and liposomes. *J. Food Biochem.*, v. 28, n. 6, p. 1-8, 2004.

- MORAIS, H.A.; MARCO, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alim.*, v. 34, n. 1, p. 59-69, 2005.
- MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J.Food Comp. and Anal.*, v.13, p.843-857, 2000.
- NEVES, B.S. Aproveitamento de subprodutos da indústria de laticínios. In: *EMBRAPA GADO DE LEITE. Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar*. Juiz de Fora, MG, 2001. p.97-108.
- NIELSEN S.S. *Food Analysis*. Gaithersburg: Aspen Publisher, 1998. 630 p.
- OTTESEN, M, SVENDSEN, I. The subtilisins. In: PERLMANN, G. E; LORAND, L. *Proteolytic enzymes - Methods in enzymology*. New York: Academic Press, 1970, p.199-215.
- OUTINEN, M.T.; TOSSAVAINEN, O.; HARJU, M.; LINKO, P. Method for removing phenilalanine from proteinaceous compositions, a product so obtained and use thereof. Valio Oy, Helsink, Finland, Patents US 5547687, A23J3/34B4; A23J3/34C; A23L1/015E2; A61K38/01B; A61K38/01D6. 12/09/1994; 20/08/1996.
- PACHECO, M.T.B; DIAS N.F.G; BALDINI, V.L; TANIKAWA, C & SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos do soro de leite. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.25, n.2, p.333-338, 2005.
- PARK, Y.K. Produção de enzimas industriais de origem animal. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Ed.) *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blugher, 2001, v. 3, p. 363 – 371.
- PEARCE, R.J. Food functionality success or failure for dairy based ingredients. *Aust. J. Dairy Technol.*, v. 50, n. 1, p. 15-23, 1995.
- PEDROCHE, J.; YUST, M.M.; GIRÓM-CALLE, J.; VIOQUE, J.; ALAIZ, M.; MATEO, C.; GUISÁN, J.M.; MILLÁN, F. Stabilization-immobilization of carboxypeptidase A to aldehyde-agarose gels. A practical example in the hydrolysis of casein. *Enz. Microb. Technol.*, v. 31, p. 711 - 718, 2002.
- PEREA, A.; UGALDE U.; RODRIGUEZT, I.; SERRAT, J.L. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: Applications in industrial whey bioconversion processes. *Enzyme Microb. Technol.*, v.15, p. 418-423, 1993.

- PERLMANN, G.E.; LORAND L. *Proteolytic Enzymes - Methods in Enzymology*, New York: Academic Press, 1970. 770 p.
- PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci Technol.*, v.11, p.347-356, 2001.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 14 ed. Piracicaba, 2000. 477p.
- PINTADO, M.E.; PINTADO, A.E.; MALCATA, F.X. Controlled whey protein hydrolysis using two alternative proteases *J. Food. Engin.*, v. 42, p. 1-13, 1999.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S. ; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, p. 597-635, 1998.
- REDE AMBIENTE Educação Ambiental. Disponível em: < http://www.redeambiente.org.br/dicionario.asp?letra=D&id_word=236>. Acesso em: 17 jan. 2007.
- REED, G. *Enzymes in food processing*. 2 ed. London: Academic Press, 1975, 573 p.
- RERAT, A. A. Nutritional supply of proteins and absorption of their hydrolysis products: consequences on metabolism *Prot. Nutr. Soc.*, v. 52, p. 335-344, 1993.
- SAHA B. C. & HAYASHI K. Research review paper Debittering of protein hydrolysates *Biotech. Adv.*, v. 19 p. 355-370, 2001.
- SCHMIDT, D. G, POLL, J. K. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Neth. Milk Dairy J.*, v.45, n.4, p.225-240, 1991.
- SCHMIDT, D. G.; MARKWIJK, W. V. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Influence of heat treatment of α -lactalbumin and β - lactoglobulin on their proteolysis by pepsin and papain. *Neth. Milk Dairy. J.*, v.47, p.15-22, 1993
- SGARBIERI, V. C. *Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações*. São Paulo: Varela, 1996. 517p.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Rev. Nutr.*, v. 17, no.4, p. 397-409, 2004.
- SILVA, J. G. ; MORAIS, H. A. ; SILVESTRE, M.P.C. Comparative study of the functional properties of bovine globin isolates and sodium caseinate. . *Food Res. Inter.*, v. 36, n. 1, p. 73-80, 2003a

- SILVA, J. G. ; MORAIS, H. A.; OLIVEIRA, A. L. ; SILVESTRE, M.P.C. . Evaluating the incorporation of globin bovine and sodium caseinate on the raw batter quality and on the stability of ham pâté. *Meat Sci.*, v. 63, n. 2, p. 177-184, 2003b.
- SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Functional properties of bovine plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *Food Sci. Technol.*, v. 37, n. 6, p. 709-718, 2003c.
- SILVA, V.D.M.; MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; AGUIAR, M. Jb; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego da pancreatina imobilizada no preparo de hidrolisados de soro de leite com teor reduzido de fenilalanina. *Alim. Nutr.*, v. 16, n. 1, p. 21-31, 2005.
- SILVESTRE, M. P. C., HAMON, M.; YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, n. 12, p. 2778-2782, 1994a.
- SILVESTRE, M. P. C., HAMON, M., YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J. Agric. Food Chem.*, v.42, n.12, p.2783-2789, 1994b.
- SISO M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review *Bioresource Technol.*, v. 57, p. 1-11, 1996.
- SHIMAMURA, S.; TAMURA, Y.; MIYAKAWA, H.; SAITO, H.; KAWAGUCHI, Y.; ISOMURA, N.; AKAZOME, Y.; OCHI, H.; KAWAMOTO, M.. Peptide mixture and products thereof. Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Tokio, Japan, Patents US 5952193, A23C 21/02; A23C 21/04; A23C 21/06; A61K 38/01. 14/04/1997; 14/09/1999.
- SMITH, E.L, MARKLAND, F.S and GLAZER, A .N. Some structure function relationships in the subtilisins. In: DESNUELLE, P; NEURATH, D.H and OTTESEN, M. *Structure-function relationship of proteolytic enzymes*. Copenhagen, Denmark, 1970.p.162-172
- SOARES, R.D.L.; BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C.R.; SILVA, V.D.M.; JANUÁRIO, J.N. ; AGUIAR, M.JB. ; SILVESTRE, M.P.C. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farm. Bon.*, v. 25, n. 3, p. 325-332, 2006.

- SVENNING, C.; MOLLAND, T.; LANGSRUD, T.; VEGARUD, G.E. A characterization study of peptides derived from casein proteolysis. In: IDF (International Dairy Federation) *Sem. Protein Fat glob. Mod.*, p. 96 – 106, 1993.
- TORRES, D.P.M. *Gelificação térmica de hidrolisados enzimáticos de proteínas do soro de leite bovino. Comportamento de sistemas aquosos mistos péptidos-polissacarídeos*. Braga: Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho. 2005. 118p. (Dissertação, Mestrado em Biotecnologia/ Engenharia de Bioprocessos)
- USDA (United States Department of Agriculture). Nutrient Data Laboratory. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>> acesso em 24/11/2006.
- USDEC News Ingredients. *Versatilidade dos ingredientes lácteos*, v. 4, n. 4, São Paulo, 2002.
- VIJAYALAKSHIMI, M.A.; LEMIEUX, L.; AMIOT, J. High performance size exclusion liquid chromatography of small molecular weight peptides from protein hydrolysates using methanol as a mobile phase additive. *J. Liq. Chromatogr.*, v. 9, p. 3559-3576, 1986.
- VIANA, F.R.; DELVIVO, F.M. ; BIZZOTTO, C.S.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Quality of ham pâté incorporated of bovine globin and plasma as fat replacers. *Meat Sci.*, v. 70, n. 1, p. 153-160, 2005.
- VIANA, F.R.; BIZZOTTO, C.S.; DIAS, D. R. ; SILVESTRE, M.P.C. Effect of different parameters on the quality of meat emulsions. *Food Technol. Biochem.*, v. 42, n. 1, p. 5-10, 2004.
- VISSER, S., SLAGEN, C. J., ROBBEN, A. J. P. M. Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr.*, v. 599, p. 205 - 209, 1992.
- VERNEUIL, B, BRESSOLIER, P. H, JULIEN, R. Quantification of amino acids, and di- and tripeptides in nutritional interest protein hydrolysates by ligand exchange chromatography in combination with Edman degradation. 4th Symposium on purification technologies, 1990, p.253-258.
- VÉRTESI, A.; SIMON, L.M.; KISS, I.; SZAJÁNI, B. Preparation, characterization and application of immobilized carboxypeptidase A. *Enz. Microb. Technol.*, v. 25, p. 73 - 79, 1999.

- WALZEM, R. L.; DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 42, p. 353 - 375, 2002.
- WHITHAKER, J.R. *Principles of enzymology for the food science*. 2 ed. California: Marcel Dekker, 1994, 625 p.
- WIT J. N. Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. *J. Dairy Sci.*, v. 81, p. 597-608, 1998.
- YAMAMOTO, A. Proteolytic enzymes. In: REED, G. *Enzymes in food processing*. 2 ed. London: Academic Press, p. 123 - 179, 1975.
- ZHANG, Y.; DORJPALAM, B; HO, C. T. Contribution of peptides to volatile formation in the Maillard reaction of casein hydrolysate with glucose. *J. Agric. Food Chem.*, v.40, p. 2467 - 2471, 1992.