

Caracterização do perfil peptídico e de aminoácidos em hidrolisados de caseína

Harriman Aley Morais, Cristiane Márcia da Silva Barbosa, Daniella Cristine Fialho Lopes, Mônica Cristina de Oliveira, Marialice Pinto Coelho Silvestre

Laboratório de Bromatologia Faculdade de Farmácia da UFMG, Av. Olegário Maciel - Belo Horizonte - MG - Brasil

RESUMO. Vários estudos têm relacionado a importância nutricional dos hidrolisados protéicos ao seu teor em oligopeptídeos, especialmente, em di- e tripeptídeos. Assim, neste trabalho, alguns parâmetros hidrolíticos foram testados, utilizando-se a papaína, a fim de se obter hidrolisados de caseína com perfil peptídico adequado para uso em dietas especiais. Os hidrolisados foram fracionados por cromatografia líquida de alta performance de exclusão molecular (SE-HPLC) e, para a quantificação dos peptídeos, empregou-se o método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF). Dentre as cinco condições de hidrólise estudadas, três deram origem a preparações com perfis peptídicos nutricionalmente semelhantes. Entretanto, o emprego da temperatura de 37°C e da relação enzima:substrato (E:S) de 2% indicou ser, provavelmente, esta a condição economicamente mais viável para ser utilizada em escala industrial.

Palavras-chave: Dietas especiais, hidrólise enzimática, caseína, peptídeos, papaína, qualidade nutricional.

SUMMARY. Characterization of peptide and aminoacid profile in casein hydrolysates. The nutritional quality of protein hydrolysates has been related in several reports to their di- and tripeptide contents. In the present work different hydrolytic conditions were tested using papain in order to prepare casein hydrolysates with a suitable peptide profile for being used in special diets. The hydrolysates were fractionated by size-exclusion HPLC and the rapid Correct Fraction Area method was used for quantifying the peptides. Among the five hydrolytic conditions studied, three of them gave rise to preparations having nutritionally similar peptide profiles. However, the use of the temperature of 37°C and enzyme:substrate ratio (E:S) of 2% may probably be the most economical condition for industrial production.

Key words: Special diets, enzymatic hydrolysis, casein, peptides, papain, nutritional quality

INTRODUÇÃO

A introdução na dieta de hidrolisados enzimáticos ricos em pequenos peptídeos pode ser importante, no sentido de propiciar uma melhor utilização das proteínas, principalmente em determinadas situações como a que ocorre em indivíduos com intolerância à proteína ou em portadores de deficiência enzimática (1,2). 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 tem relação direta com a diminuição da imunogenicidade (3-5). 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 (6).

O valor nutricional dos hidrolisados depende da proteína de origem, do tipo de hidrólise (enzimática ou química) e do tamanho da cadeia peptídica. A qualidade de uma proteína alimentar é função da quantidade e do tipo de aminoácidos

em sua composição, especialmente dos essenciais, representando uma medida da eficácia com a qual pode ser utilizada pelo organismo. Uma proteína de alta qualidade contém aminoácidos essenciais em proporções aproximadas àquelas que satisfazem as necessidades humanas (7). Assim, a caseína foi selecionada para o presente trabalho, devido ao seu alto valor nutricional, elevada susceptibilidade à ação catalítica de todas as proteases conhecidas (8) e à disponibilidade no mercado. Além disso, a qualidade nutricional de hidrolisados protéicos está diretamente relacionada ao seu perfil peptídico, uma vez que, segundo González-Tello (2), a composição destas preparações deve apresentar elevados teores de di- e tripeptídeos e peptídeos com massa molecular média de 500 Da, baixa porcentagem de peptídeos com massa molecular maior que 800 Da e de aminoácidos livres.

Sendo assim, torna-se importante utilizar um método eficiente para o fracionamento e a quantificação de peptídeos e de aminoácidos livres dos hidrolisados protéicos, além de se proceder à avaliação da distribuição de certos aminoácidos na forma de em que são mais facilmente absorvidos pelo organismo (9,10).

Este trabalho teve como objetivo estudar diferentes condições de hidrólise a fim de se obter hidrolisados de caseína com perfil peptídico adequado para uso em dietas especiais. Para isto, foram testados vários parâmetros hidrolíticos empregando-se a enzima papaína.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

O sistema de HPLC isocrático consistiu de uma bomba (série HP1100) e de um detector espectrofotométrico em UV-VIS, acoplado a um computador com software HPChemstation (Avondale, USA). Foi utilizada a coluna cromatográfica [poli-(2-hidroxietilaspártamida)-sílica - PHEA], 250 X 9,4 mm, 5µm e 200 Å (PolyIC, Columbia, MD). A papaína foi gentilmente doada pela BIOBRÁS (Montes Claros, Brasil). A caseína bovina (C7078) foi adquirida da Sigma Chemical (St.Louis, MO). O ácido fórmico foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água para uso no cromatógrafo foi purificada através da passagem pelo Sistema de Purificação de Água Aries (Vaponics, EUA). As membranas de celulose, utilizadas para filtração das amostras (0,20 µm) e dos solventes (0,45 µm), foram adquiridas da Sartorius (Alemanha).

Métodos

Preparo dos hidrolisados de caseína

Foram preparados cinco hidrolisados protéicos. As soluções de caseína a 0,125g% (p/v) em tampão fosfato 0,01mol/L (pH 6,5 e 7,5) foram, inicialmente, pré-aquecidas em banho-maria a 90°C por 30 minutos. Posteriormente, a temperatura foi ajustada para cada caso, e a papaína foi adicionada numa dada concentração, de maneira a obter a relação E:S desejada. O tempo total de hidrólise foi de 5h. Os outros parâmetros das reações estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1
Parâmetros hidrolíticos empregados no preparo dos hidrolisados de caseína pela papaína

Hidrolisados	Temperatura (°C)	pH	E:S (%)	Tempo (h)
H1	37	7,5	4	5
H2	37	7,5	2	5
H3	40	7,5	4	5
H4	37	6,5	4	5
H5	60	7,5	4	5

E:S = relação enzima:substrato

Fracionamento dos hidrolisados de caseína

O fracionamento dos hidrolisados foi realizado por SE-HPLC, em coluna PHEA, como descrito por Silvestre *et al.* (10). As amostras foram dissolvidas a uma concentração de 1g% (p/v) em solução de ácido fórmico 0,05mol/L (pH 2,5) e cromatografadas à temperatura ambiente, sob condições isocráticas, a um fluxo de 0,5mL/min, durante 35 min. A fase móvel foi filtrada, através de membrana de 0,45 µm, e degaseificada em banho de ultra-som, imediatamente antes do uso. A detecção dos picos cromatográficos foi efetuada em três comprimentos de onda: 230, 280 e 300nm. As amostras foram analisadas em triplicatas e as frações foram separadas, de acordo com o tempo de retenção, sendo F1, de 14,4 a 18,9 min; F2, de 18,9 a 22,4 min; F3, de 22,4 a 23,4 min; e F4, de 23,4 a 32,7min.

Quantificação de peptídeos e aminoácidos livres nos hidrolisados de caseína

O método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF), desenvolvido por Silvestre *et al.* (10), foi utilizado para quantificar os peptídeos e aminoácidos livres presentes nos hidrolisados de caseína. As amostras foram fracionadas e os valores da ACF calculados, de acordo com a curva padrão estabelecida por Morato *et al.* (11).

Análise estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Para verificar a presença de efeitos significativos entre os diferentes tratamentos, foi adotado o delineamento em Análise Fatorial 5x4 (hidrolisados x frações cromatográficas). Para a determinação das diferenças entre as médias e o conteúdo de aminoácidos das frações cromatográficas dos hidrolisados de caseína foi realizado o teste de Duncan (12).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização dos hidrolisados de caseína

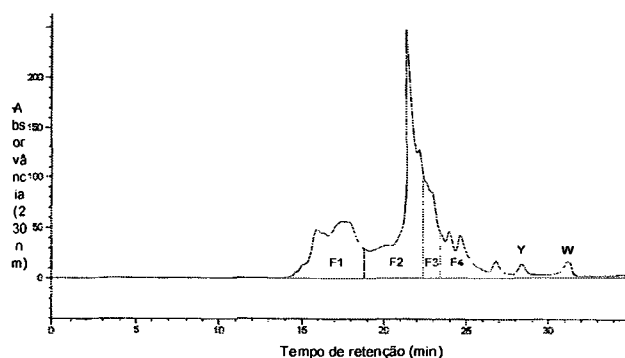
Fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência - exclusão molecular (SE-HPLC)

O perfil cromatográfico do hidrolisado H3, a 230 nm, está apresentado na Figura 1. Os hidrolisados protéicos foram separados em quatro frações, conforme descrito anteriormente por SILVESTRE *et al.* (9), Morato *et al.* (11) e Carreira (13). A fração 1 corresponde aos peptídeos contendo mais que 7 resíduos de aminoácidos; a fração 2 de 4 a 7 resíduos; a fração 3, de 2 a 3 resíduos e a fração 4 contendo os aminoácidos livres. Os últimos dois picos na fração 4 correspondem à tirosina (pico Y) e ao triptofano (pico W). Assim sendo, a técnica de SE-HPLC empregada no presente trabalho, mostrou ser eficiente na caracterização

de hidrolisados protéicos, especialmente nos casos em que o interesse está voltado para o fracionamento de peptídeos de baixa massa molecular, ou seja, inferior a 1000 Da.

FIGURA 1

Perfil cromatográfico do hidrolisado H3 (4%, pH 7,5, 40°C, 5h) 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



Diferentes técnicas têm sido empregadas no fracionamento de peptídeos de hidrolisados protéicos. A maioria refere-se a peptídeos com massa molecular superior a 1000 Da. Dentre estes métodos destacam-se a eletroforese em gel de poliacrilamida - sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE), a cromatografia de exclusão molecular (SEC), HPLC capilar e de troca de ligante (LE-HPLC) e a SE-HPLC (14- 18).

Entretanto, o emprego destas técnicas tem demonstrado uma série de inconvenientes, tais como interações secundárias (eletrostáticas ou hidrofóbicas) entre os solutos e a fase estacionária e a ineficiência para separar pequenos peptídeos (19-21). Outros autores, empregando a SE-HPLC (14) ou a HPLC capilar (16), relataram a dificuldade de separar os peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, tendo observado uma superposição de pesos moleculares.

Distribuição de tirosina e triptofano nas frações cromatográficas

A fim de se ter uma idéia mais precisa do valor nutricional dos hidrolisados protéicos, avaliou-se a distribuição de tirosina e triptofano nas diferentes frações cromatográficas, especialmente na fração F3 (Tabela 2), visto que di- e tripeptídeos representam a forma mais facilmente absorvida destes dois aminoácidos. Além disso, considerando-se a baixa solubilidade da tirosina livre, seria interessante a sua substituição em preparações dietéticas, por di- e tripeptídeos, contendo altos teores de tirosina solúvel (22).

TABELA 2

Distribuição de tirosina e triptofano (%) nas frações cromatográficas dos hidrolisados de caseína

Hidrolisado	Aminoácido	Frações cromatográficas			
		F1	F2	F3	F4
H1	Tyr	19,31c	20,60b	49,93a	10,17d
	Trp	19,30x	20,53w	50,01v	10,16z
H2	Tyr	13,99e	25,19a	32,33e	28,49a
	Trp	13,97y	25,14v	32,38z	28,50v
H3	Tyr	20,32b	14,67c	36,44d	28,56a
	Trp	20,38w	14,80x	36,40y	28,43w
H4	Tyr	13,92d	13,64e	47,33b	25,11c
	Trp	13,94y	13,66z	47,28w	25,11y
H5	Tyr	20,98a	14,45d	38,78c	25,79b
	Trp	20,93v	14,42y	38,87x	25,78x

*Os valores representam a média das triplicatas. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Os dados referem-se à porcentagem da área total das quatro frações, medida a 230nm. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

A distribuição foi estimada baseando-se nas áreas relativas dos dois resíduos a 230 nm. Como apresentado na Tabela 2, o hidrolisado H1 foi o mais vantajoso, uma vez que contém teores mais elevados de tirosina e triptofano na forma de di- e tripeptídeos.

Comparação entre os diferentes tratamentos enzimáticos

Efeito da relação E: S

A influência da relação E:S na ação da papaína sobre a caseína pode ser avaliada na Figura 2.

Observa-se que a alteração da relação E:S de 2% para 4% (hidrolisados H2 e H1, respectivamente), alterou significativamente o conteúdo de todas as frações cromatográficas, produzindo um perfil peptídico de qualidade nutricional inferior. Houve diminuição dos níveis de di- e tripeptídeos, assim como aumento do teor de aminoácidos livres e médios peptídeos. A única alteração vantajosa, do ponto de vista nutricional, refere-se ao decréscimo no conteúdo de grandes peptídeos (Tabela 3). Considerando-se que a papaína apresenta baixa especificidade, esta redução expressiva na quantidade de di- e tripeptídeos não era esperada. O aumento da E:S, ao invés de promover a quebra dos grandes e médios peptídeos a di- e tripeptídeos, levou à clivagem destes a aminoácidos livres. Isto poderia estar associado, pelo menos em parte, ao fato de que a 2%, houve

apenas pequena formação de di- e tripeptídeos contendo fenilalanina como segundo aminoácido a partir da porção carboxi-terminal os quais, de acordo com Lenier (23) e Reed (24), não serviriam de substrato para a ação desta enzima.

FIGURA 2

Ação isolada da papaína: efeito da relação E:S. H1: 4%; H2: 2%. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de diferentes frações de um hidrolisado

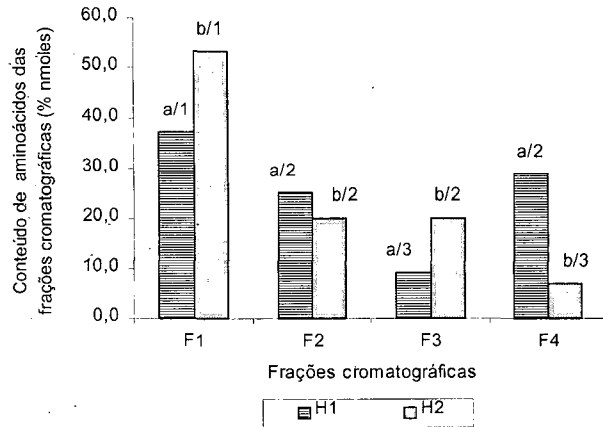


TABELA 3

Teor de peptídeos e de aminoácidos livres (% nmoles) das frações cromatográficas dos hidrolisados testes

Hidrolisados	Frações			
	F1	F2	F3	F4
H1	37,13c/1	25,07c/2	9,01c/3	28,79a/2
H2	53,29a/1	19,99d/2	19,96a/2	6,76b, c/3
H3	33,23d/2	41,46a/1	14,94b/3	10,37b/4
H4	52,68a/1	36,65b/2	8,91c/3	1,76d/4
H5	42,24b/1	40,60a/1	12,10b, c/2	5,06c, d/3

Os valores são apresentados em nmoles% (porcentagem do número de nmoles das quatro frações). Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de diferentes frações de um hidrolisado. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres.

Este efeito da papaína sobre o perfil peptídico foi mais prejudicial do que o da pepsina, uma vez que Carreira (13), variando a relação E:S nas mesmas proporções, não observou alterações significativas nos conteúdos das frações F1, F2 e F4 e, ainda, obteve uma elevação nos níveis de di- e tripeptídeos.

Comparando-se a ação da papaína com a da subtilisina, observa-se que o segundo tratamento foi bem superior, do ponto de vista nutricional. Assim, Morato *et al.* (11), ao passar a E:S de 2% para 4%, obtiveram um decréscimo dos teores de grandes peptídeos e aminoácidos livres, bem como um aumento do conteúdo de médios peptídeos e também de di- e tripeptídeos.

Estes resultados contradizem a afirmativa de González-tello (2) de que uma alteração na relação E:S não exerce qualquer influência na distribuição de peptídeos nas frações cromatográficas de hidrolisados protéicos. Existem relatos na literatura que confirmam esta observação. Assim, Freitas *et al.* (3) não obtiveram uma alteração do perfil cromatográfico de um hidrolisado de caseína, ao aumentar de 3,7 vezes a concentração de pancreatina. Segundo os autores, este limite aparente na hidrólise da caseína, pode estar relacionado, pelo menos em parte, à sua seqüência de aminoácidos e a especificidade da enzima empregada. Apesar destes resultados estarem de acordo com o relato de González-tello (2), uma explicação para isso seria a de que os suportes cromatográficos, empregados por estes autores, foram ineficientes para a separação de peptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia, especialmente de di- e tripeptídeos (20, 25).

Todavia, os resultados apresentados por outros pesquisadores estão de acordo com os obtidos no presente trabalho, bem como os de Carreira (13) e Morato *et al.* (11). Assim, Loosen *et al.* (26) testaram o emprego da subtilisina na hidrólise da caseína, variando-se a relação E:S de 1 a 4%, sendo que os melhores resultados foram obtidos empregando-se a relação E:S de 2%, levando à obtenção de um hidrolisado contendo 75% de di- e tripeptídeos e apenas 5% de aminoácidos livres.

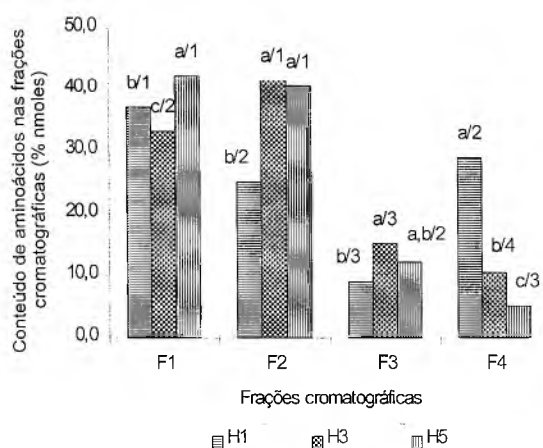
Com relação à distribuição de tirosina e triptofano (Tabela 2), a alteração na relação E:S de 2% para 4% (H2 e H1, respectivamente) foi vantajosa, pois aumentou o conteúdo de ambos aminoácidos na forma de di- e tripeptídeos. Ao promover esta mesma alteração empregando a subtilisina para hidrolisar a caseína, Morato *et al.* (11) obtiveram resultados semelhantes. Por outro lado, Carreira (13), utilizando a pepsina, observou que este aumento na relação E:S reduziu o conteúdo de tirosina e triptofano na fração F3.

Efeito da temperatura

O efeito da temperatura na ação da papaína sobre a caseína está representado na Figura 3.

FIGURA 3

Ação isolada da papaína: efeito da temperatura. H1: 37°C; H3: 40°C; H5: 60°C. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livre. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de diferentes frações de um hidrolisado.



Observa-se que a variação da temperatura de 37°C para 40°C (hidrolisados H1 e H3, respectivamente) produziu uma elevação nos teores de di- e tripeptídeos, além de reduzir os níveis de aminoácidos livres e de grandes peptídeos (Tabela 3). Este efeito da papaína sobre a caseína foi diferente daquele da pepsina, uma vez que Carreira (13) mostrou que, ao passar de 37°C para 40°C, não houve alteração nos teores de di- e tripeptídeos, como também nos de aminoácidos livres.

O aumento da temperatura de 40°C para 60°C (H3 e H5, respectivamente), produziu um perfil peptídico ligeiramente inferior, do ponto de vista nutricional. Se por um lado obteve-se uma queda expressiva (cerca de 50%) na quantidade de aminoácidos livres, por outro este tratamento elevou os teores de grandes peptídeos e provocou uma pequena redução nos níveis de di- e tripeptídeos. Verifica-se que, entre os tratamentos realizados, o emprego de temperatura de 40°C foi o mais vantajoso, do ponto de vista nutricional, pois permitiu a obtenção de um hidrolisado apresentando o melhor perfil peptídico para ser empregado em dietas especiais, como

descrito por González-tello (2). Ressalta-se, ainda, que neste caso também, a ação da papaína sobre a caseína produziu melhores resultados do que a da pepsina, uma vez que ao passar de 40° para 60°C, esta enzima não contribuiu para reduzir os teores de aminoácidos livres (13).

O efeito da elevação da temperatura (de 40°C para 50°C) sobre o perfil peptídico de hidrolisados de caseína obtidos pela ação da subtilisina foi, também, estudado recentemente. Assim, Morato *et al.* (11) mostraram que o emprego da temperatura acima de 40°C foi prejudicial do ponto de vista nutricional, tendo obtido resultados semelhantes ao do presente trabalho, ao se passar de 40°C para 60°C.

Chataud *et al.* (1) e Loosen *et al.* (26) recomendam o emprego de temperaturas superiores a 50°C para o preparo de hidrolisados ricos em di- e tripeptídeos, usando a subtilisina. De acordo com estes autores, isto poderia reduzir o tempo de hidrólise, sem desnaturação significativa da enzima, e minimizar a contaminação microbiana. Entretanto, os resultados aqui apresentados, assim como os obtidos por Morato *et al.* (11) e Carreira (13), mostraram o contrário, uma vez que o emprego de temperaturas superiores a 40°C foi prejudicial para o perfil peptídico dos hidrolisados. Este tratamento somente foi benéfico para a tirosina, que teve seu teor elevado 5 vezes na fração F3, ao se passar de 40 °C para 50 °C e empregando-se a subtilisina para hidrolisar a caseína (11)

Com relação à distribuição de tirosina e triptofano nas frações cromatográficas (Tabela 2), o emprego de temperaturas superiores a 37°C prejudicou o perfil peptídico. Assim, ao passar de 37°C (H1) para 40°C (H3) e de 40°C para 60°C (H5) observou-se uma redução e um aumento nos teores destes aminoácidos na fração F3, respectivamente. Entretanto, este aumento observado para H5 não foi suficiente para aproximar dos valores encontrados em H1. Efeito semelhante foi obtido pela ação da pepsina, empregando-se a mesma variação da temperatura de hidrólise da caseína (13).

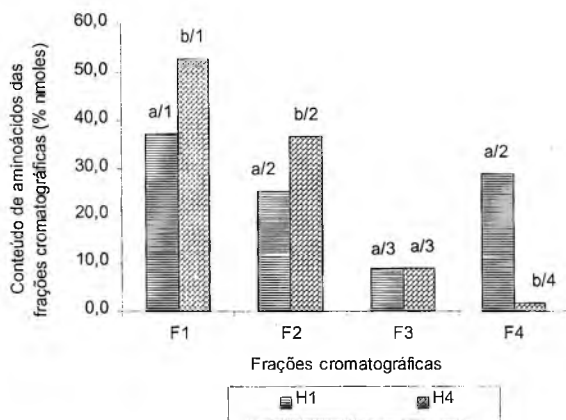
Efeito do pH

A influência do pH na ação da papaína sobre a caseína está representada na Figura 4.

Observa-se que o emprego destes dois valores de pH, situados na faixa ótima de atuação da papaína (6,0 e 7,5) (27), produziu algumas diferenças significativas no perfil peptídico. O hidrolisado obtido no pH 6,5 (H4) mostrou-se ligeiramente superior, do ponto de vista nutricional, ao preparado no pH 7,5 (H1). Ambos hidrolisados apresentaram os mesmos teores de di- e tripeptídeos. Mas, se por um lado o teor de grandes peptídeos de H1 é inferior ao de H4, a quantidade de aminoácidos livres neste hidrolisado reduziu quase seis vezes em relação a H1.

FIGURA 4

Ação isolada da papaína: efeito do pH. H1: pH = 7,5; H4: pH = 6,5. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de diferentes frações de um hidrolisado



Este efeito da influência do pH sobre o perfil peptídico de hidrolisados protéicos, sempre verificado na faixa ótima de ação das enzimas, já foi relatado anteriormente. Assim, Morato *et al.* (11) mostraram que o hidrolisado de caseína obtido pela subtilisina, em pH 7,5, foi nutricionalmente superior àquele preparado em pH 8,0, já que apresentou maior teor de di- e tripeptídeos, bem como menor quantidade de grandes peptídeos e aminoácidos livres. De forma semelhante, Carreira (13) verificou uma alteração do perfil peptídico, ao reduzir o pH da hidrólise de 2,5 para 1,9, empregando a pepsina. Do ponto de vista nutricional, esta alteração foi benéfica, pois elevou os teores de di- e tripeptídeos e reduziu o conteúdo de grandes peptídeos, não tendo sido observadas diferenças significativas entre as quantidades de médios peptídeos e de aminoácidos livres.

A distribuição de tirosina e triptofano (Tabela 2) foi afetada pela variação do pH da hidrólise. O melhor resultado foi obtido no pH 7,5, visto que o hidrolisado H1 apresentou os teores mais elevados destes aminoácidos na forma de di- e tripeptídeos. Resultados semelhantes foram obtidos por Morato *et al.* (11) que, ao testarem diferentes valores de pH dentro da faixa ótima de ação da subtilisina, também observaram diferenças entre os conteúdos de tirosina e triptofano na fração F3, obtendo melhor distribuição destes aminoácidos em pH 6,5 e 8,0. Da mesma forma, Carreira

(13), alterando o pH dentro da faixa ótima de ação da pepsina, encontrou diferentes resultados em relação à distribuição de tirosina e triptofano. Assim, maior conteúdo destes aminoácidos aromáticos na forma de di- e tripeptídeos foi observado quando o pH aumentou de 1,9 para 2,5.

O conjunto dos resultados apresentados neste item pode ser, provavelmente, explicado pela carga dos resíduos de aminoácidos nas moléculas das enzimas e da caseína em diferentes valores de pH, afetando a disponibilidade das ligações peptídicas ao ataque enzimático e, conseqüentemente, alterando os produtos obtidos, como relatado anteriormente por Morato *et al.* (11).

Síntese dos resultados obtidos pela ação da papaína

Considerando a afirmativa de González-Tello *et al.* (2), dentre os hidrolisados preparados, pode-se concluir que H2, H3 e H5 apresentaram as melhores características para serem usados em dietas especiais, ou seja, maior teor de di- e tripeptídeos (F3) e peptídeos com massa molecular média de 500 Da (F2 + F3), a menor porcentagem de peptídeos com massa molecular maior que 800 Da (F1), bem como nível mais baixo de aminoácidos livres (F4).

A escolha do melhor dentre estes três hidrolisados para ser preparado em larga escala dependeria de uma avaliação econômica. Entretanto, a princípio tudo indica que o hidrolisado H2 seria o escolhido, uma vez que no seu preparo foram empregados os menores valores de temperatura (37°C) e da relação E:S (2%), condições que devem ser vantajosas para uma produção em escala industrial.

Alguns parâmetros hidrolíticos, tais como o tempo de reação, poderiam ainda, ser alterados, na busca de um melhor perfil peptídico. Entretanto, deve-se estar consciente de que acima de 5h de hidrólise, o risco de contaminação é considerável (1, 26).

CONCLUSÃO

A ação da papaína foi mais eficiente na produção de di- e tripeptídeos quando se empregou uma relação E:S de 2%, pH 7,5 e temperatura de 37°C (H2). Com relação à distribuição de tirosina e triptofano, na forma de di- e tripeptídeos, os melhores resultados foram obtidos nos mesmos valores de pH e temperatura, mas nesse caso foi necessário empregar uma relação E:S de 4% (H1).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro a este trabalho, na forma de bolsas de estudo ou de verba para a pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Chataud J, Desreumeux S, Cartwright T, Procédé de fabrication d'un hydrolysate enzymatique 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.
2. González-Tello P, Camacho F, Jurado E, Paéz MP, Guadix EM. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular-weight range, Biotech. Bioeng., 1994; 44(4):529-532.
3. Freitas O, Padovan GJ, Vilela L, Santos JE, Dutra de Oliveira JE, Greene LJ. Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition. J. Agric. Food Chem., 1993; 41(8):1432-1438.
4. Boza JJ, Martínez-Augustin O, Gil A. Nutritional and antigenic characterization of an enzymatic whey protein hydrolysate. J. Agric. Food Chem., 1995; 43(4):872-875.
5. Synowiecki J, Jagielka R, Shahidi, F. Preparation of hydrolysates from bovine red blood cells and their debittering following plastein reaction. Food Chem., 1996; 57(3):435-439.
6. Frokjaer S. Use of hydrolysates for protein supplementation. Food Tech., 1994; 48(10):86-88.
7. Cheftel JC, Cuq JL, Lorient, D. Protéines alimentaires: biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle, modifications chimiques. Paris: Tec & Doc Lavoisier, 1985.
8. Morato AF, Carreira RL, Junqueira RG, Silvestre MPC. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. J. Food Composition and Analysis, 2000; 13:843-857.
9. Adachi S, Kimura Y, Murakami K, Matsuno R, Yokogoshi H. Separation of peptide groups with definite characteristics from enzymatic protein hydrolysate. Agric. Biol. Chem., 1991; 55(4):925-932.
10. Silvestre MPC, 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., 1994; 42(12):2778-2782.
11. Silvestre MPC, Hamon M, Yvon M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. J. Agric. Food Chem., 1994; 42(12):2783-2789.
12. Gomes FP. Curso de estatística experimental. 13 ed. Piracicaba: 1990.
13. Carreira RL. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de caseína: perfil peptídico e aminoácidos essenciais [Dissertação]. Belo Horizonte (MG): Faculdade de Farmácia/ Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.
14. Lemieux L, Amiot J. Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography to separation of peptides from phosphorylated and dephosphorylated casein hydrolysates. J. Chromatogr., 1990; 73(1):189-206.
15. Silvestre, MPC. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. Food Chem., 1997; 60(2):263-271.
16. Davis M, Lee TD. Analysis of peptide mixtures by capillary high performance liquid chromatography: a practical guide to small-scale separations. Prot. Sci., 1992;1:935-944.
17. Visser S, Stagen CJ, Robben AJPM. Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. J. Chromatogr., 1992; 599(2):205-209.
18. Gallagher J, Kanekanian AD, Evans EP. Hydrolysis of casein: a comparative study of two proteases and their peptide maps. Int. J. Food Sci. Tech., 1994; 29(3):279-285.
19. Verneuil B, Bressolier PH, 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, 1990:253-258.
20. Lemieux L, Piot JM, 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., 1991; 32(3):499-504.
21. Golovchenko N, Kataeva IA, Akimenko VK. Analysis of pH-dependent protein interactions with gel filtration medium. J. Chromatogr., 1992; 591(4):121-128.
22. Furst P, Albers S, Stehle P. Dipeptides in clinical nutrition. Proc. Nutr. Soc., 1990; 49(3):343-359.
23. Lenier IE. The sulfhydryl proteases. In: Whitaker, JR. Food related enzymes. Advances in Chemistry Series 136. Washington: American Chemistry Society, 1974.
24. Reed G. Enzymes in food processing. 2ed. New York: Academic Press, 1975.
25. Kopaciewicz W, Regnier FE. Nonideal size-exclusion chromatography of proteins: effects of pH at low ionic strength. Anal. Biochem., 1982; 126(13):8-16.
26. Loosen, PC, Bresspollier PR, Julieen AR, Pejoan CH, Verneuil B. Procédé pour préparer un hydrolysate 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.
27. Whitaker JR. Principles of enzymology for the food sciences. New York: Marcel Decker, 1972:526-529.

Recibido: 20-03-2001

Aceptado: 17-10-2001