

Emprego da hidrólise enzimática utilizando subtilisina para elevar o valor nutricional do soro de leite

Use of enzymatic hydrolysis using subtilisin for increasing the nutritional value of whey

ABSTRACT

AFONSO, W. O.; BIASUTTI, E. A. R.; GERALDI, L. M.; SILVA, V. D. M.; CAPOBIANGO, M.; SILVESTRE, M. P. C. Use of enzymatic hydrolysis using subtilisin for increasing the nutritional value of whey. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* = J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP, v. 34, n. 1, p. 97-114, abr. 2009.

With the aim of increasing the nutritional value of whey, a subtilisin was used for hydrolysing its proteins and obtaining high di-tripeptide and free amino acid contents, besides small amounts of large peptides. The whey protein concentrate was used as raw material and different hydrolytic conditions were tested such as reaction time (5, 10 and 15h), enzyme:substrate ratio (1:100, 2:100 and 4:100) and raw material concentration (10% and 15%). The peptide profiles were initially characterized using a fractionation method by a size-exclusion-HPLC followed by a rapid Corrected Fraction Area method for quantifying the peptides. The action of subtilisin showed varied effects depending on the hydrolysis parameters used. The best peptide profile was obtained using a raw material concentration of 10%, an enzyme:substrate ratio of 4:100, after 5h reaction, reaching 13.34% of di-tripeptides, 45.56% of free amino acids and just 12.28% of large peptides.

Keywords: Proteins. Enzymatic hydrolysis. Subtilisin. Di-tripeptides. Peptide profile. Whey.

WENDEL DE OLIVEIRA AFONSO¹; ELIZA AUGUSTA ROLIM BIASUTTI¹; LETÍCIA MENICUCCI GERALDI¹; VIVIANE DIAS MEDEIROS SILVA¹; MICHELÉ CAPOBIANGO¹; MARIALICE PINTO COELHO SILVESTRE¹

¹Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Endereço para

correspondência:

Marialice Pinto Coelho Silvestre. Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Avenida Antonio Carlos, 6627 – sala 3070-B3.

CEP 31270-901.

Belo Horizonte, MG, Brasil.
e-mail:

malice@farmacia.ufmg.br

Agradecimentos:

à CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

RESUMEN

Con el propósito de mejorar el valor nutricional del suero lácteo, fue empleada una subtilisina para hidrolizar sus proteínas y obtener un alto contenido de di-tri péptidos, aminoácidos libres con reducción del tenor de grandes péptidos. La materia prima fue el concentrado proteico del suero lácteo y diferentes condiciones de hidrólisis fueron probadas: tiempo de hidrólisis (5, 10 y 15h), la relación enzima: substrato (1:100, 2:100 y 4:100) y la concentración de la materia prima (10% y 15%). Se caracterizó el perfil peptídico por medio de fraccionamiento de los hidrolizados utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia de exclusión molecular y la cuantificación de los componentes de las fracciones cromatográficas fue realizada por el método rápido del área corregida de la fracción. Para los parámetros estudiados, se observaron efectos variados de la subtilisina en la obtención de los hidrolizados, y el mejor perfil peptídico fue encontrado cuando se utilizó la concentración de materia prima de 10%, relación enzima: substrato de 4:100 y 5 horas de reacción. Estas condiciones dieron origen a un hidrolizado compuesto de 13,34% de di-tripeptídeos, 45,56% de aminoácidos libres y sólo 12,28% de grandes péptidos.

Palabras clave: Suero lácteo.
Proteínas. Hidrólisis enzimática.
Subtilisina. Di-tripéptidos.
Perfil peptídico.

RESUMO

Com o intuito de elevar o valor nutricional do soro de leite, foi empregada uma subtilisina para hidrolisar suas proteínas e obter alto teor de di-tripeptídios, e de aminoácidos livres, além de pequena quantidade de grandes peptídios. A matéria-prima utilizada foi o concentrado proteico do soro de leite e diferentes condições hidrolíticas foram testadas, tais como o tempo de reação (5, 10 e 15h), a relação enzima:substrato (1:100, 2:100 e 4:100) e a concentração da matéria-prima (10% e 15%). Caracterizou-se o perfil peptídico pelo fracionamento dos hidrolizados por 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. Para os parâmetros estudados, observaram-se efeitos variados da subtilisina na obtenção dos hidrolizados, sendo que o melhor perfil peptídico foi encontrado ao se empregar a concentração da matéria-prima de 10%, relação enzima:substrato de 4:100, após 5 h de reação, tendo obtido 13,34% de ditripeptídeos, 45,56% de aminoácidos livres e, apenas, 12,28% de grandes peptídios.

Palavras-chave: Soro de leite.
Proteínas. Hidrólise enzimática.
Subtilisina. Di-tripeptídios.
Perfil peptídico.

INTRODUÇÃO

Soro de leite é o líquido remanescente após a precipitação e remoção da caseína, principal proteína do leite. 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).

Apesar de ser uma importante fonte nutricional de proteínas, o uso do soro de leite, *in natura*, é limitado devido às características perecíveis do material, a alta diluição de seus componentes e o conteúdo de minerais. Desta forma, diversas tecnologias de processamento têm sido aplicadas de maneira a agregar valor a esta matéria-prima. Para tal, destacam-se processos baseados na manipulação das propriedades físico-químicas proteicas, os quais são capazes de isolar as principais proteínas do leite, caseínas e proteínas do soro (BRANS et al., 2004).

O concentrado de proteínas do soro, CPS, produto originado da separação por membranas das proteínas do soro, e matéria-prima do presente trabalho, contém de 35 a 80% de proteínas, enquanto o isolado proteico do soro, IPS, possui de 80 a 95% de proteínas. Várias aplicações importantes estão associadas ao CPS, sendo um ingrediente amplamente utilizado na indústria de alimentos em uma grande variedade de produtos como carnes, bebidas, produtos de padaria e formulações infantis, devido às excelentes propriedades funcionais destas proteínas (BRANS et al., 2004).

Um dos processos que promovem uma exponencial agregação de valor ao CPS é a hidrólise proteica, especialmente a enzimática. Este tratamento propicia o rompimento da molécula proteica em unidades menores e tem se destacado na melhoria das propriedades nutricionais e funcionais das proteínas (BOZA et al., 2000).

Dentre as enzimas utilizadas na hidrólise de proteínas, encontram-se as subtilisinas, que são originárias de várias espécies do gênero *Bacillus sp*, representam a segunda maior família de serino-proteases, atuam numa faixa de pH alcalino ou neutro e apresentam ponto isoelétrico de aproximadamente 9,4 (RAO et al., 1998; REED, 1975; SGARBIERI, 1996). A ação proteolítica das subtilisinas mostra preferência por ésteres de aminoácidos aromáticos e, em menor extensão, por ésteres da lisina e arginina. A ação das subtilisinas parece ocorrer principalmente nas ligações peptídicas envolvendo os grupos amino e carboxila de resíduos neutros e ácidos (BEYNON; BOND, 1989; PEREA et al., 1993).

Além da melhoria das propriedades funcionais e sensoriais, é possível aumentar o valor nutricional das proteínas por meio do tratamento enzimático. Um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado para utilização dietética é sua distribuição quanto ao tamanho dos peptídios sendo utilizadas, mais efetivamente, aqueles contendo um elevado teor de oligopeptídios, especialmente, di-tripeptídios (BOZA et al., 2000; FRENHANI; BURINI, 1999).

A introdução na dieta de hidrolisados enzimáticos ricos em pequenos peptídios pode ser importante, no sentido de propiciar uma melhor utilização das proteínas. Neste sentido, os hidrolisados proteicos vêm sendo usados na fabricação de alimentos especiais para diversos grupos, tais como recém-nascidos prematuros, crianças com diarreia, gastroenterite, má-absorção, fenilcetonúria, pessoas com alergia a proteínas, visto que o decréscimo no tamanho dos peptídios possui relação direta com a diminuição da imunogenicidade (CLEMENTE, 2000; LI-JUN; CHUAN-HE; ZHENG, 2007). Além disto, estes preparados enzimáticos podem ser úteis na suplementação dietética de idosos (PALLAS, 2002), pacientes HIV positivos (YUST et al., 2004), na nutrição de esportistas (PIMENTA et al., 2006), como também, em dietas para controle de peso (AOYAMA et al., 2000).

Silvestre, Hamon e Yvon (1994a) desenvolveram um método para fracionamento e quantificação de peptídios, empregando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli (2-hidroxietil-aspartamida)-sílica (PHEA), que lhes possibilitou separar peptídios com massas moleculares menores do que 1000 Da, sendo este método empregado neste trabalho.

O objetivo deste trabalho consistiu no emprego de uma subtilisina para hidrolisar as proteínas do soro do leite, testando-se o efeito de alguns parâmetros hidrolíticos, além de caracterizar o perfil peptídico dos hidrolisados proteicos, de acordo com o tamanho da cadeia molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

O concentrado proteico de soro de leite com 35% de proteína (CPS) na forma de pó (Kerrylac 750) foi doado pela Kerry do Brasil Ltda (Três Corações, MG, Brasil). A enzima subtilisina utilizada (Protemax N200) foi fornecida pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil), é uma endopeptidase de origem bacteriana (*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 20 min.

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

MÉTODOS

Determinação da composição química do concentrado proteico do soro de leite

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

Preparo dos hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico do soro de leite

Foram preparados 18 hidrolisados enzimáticos, utilizando-se a subtilisina como enzima proteolítica. As suspensões contendo 10% e 15% (p/v) do concentrado proteico do soro do leite tiveram o pH ajustado para 7,0 com Na₂CO₃ 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 5 h, 10 h e 15 h de hidrólise, a reação foi interrompida por meio do aumento da temperatura para 80°C por 20 min. Os hidrolisados obtidos foram liofilizados. As condições de hidrólise estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 – Variáveis hidrolíticas empregadas no preparo dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite

Hidrolisados	Concentração da Matéria-prima (% 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.

Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite

A caracterização do perfil peptídico foi realizada em duas etapas: fracionamento dos peptídios, de acordo com o tamanho da cadeia, e sua posterior quantificação. O fracionamento dos peptídios foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) em coluna PHEA, conforme descrito por Silvestre, Hamon e Yvon (1994a). As amostras foram dissolvidas em uma concentração de 1g⁰% (p/v) na fase móvel (ácido fórmico a 0,05mol/L, pH 2,5) e submetidas à cromatografia, à temperatura ambiente, sob condições isocráticas, a um fluxo de 0,5mL/min, durante 35 min, o volume injetado foi de 20µL. A fase móvel foi filtrada, através da membrana de 0,45µm (Millipore Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e desgaseificada imediatamente antes do uso. As frações foram separadas de acordo com o tempo de eluição, sendo F1, de 11,5 a 16,0 min (grandes peptídios, com mais de 7 resíduos de aminoácidos); F2, de 16,0 a 19,5 min (peptídios médios, entre 4 e 7 resíduos); F3, de 19,5 a 20,5 min (di-tripeptídios); e F4, de 20,5 a 32,0 min (aminoácidos livres).

O método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF), desenvolvido por Silvestre, Hamon e Yvon (1994b) foi utilizado para quantificar os peptídios e aminoácidos livres presentes nos hidrolisados do soro de leite. Resumidamente, neste método, foram preparados cinco hidrolisados padrão de CPS a 1% (p/v), pH 7,0, preparados com as enzimas tripsina e pancreatina (sendo, dois com tripsina e três com pancreatina), os quais foram fracionados por SE-HPLC em coluna PHEA. As quatro frações obtidas foram coletadas (Coletor de Frações, modelo CF-1, Spectrum/Chrom, Houston, TX, EUA) sendo o solvente removido de cada fração em evaporador Centrivap (modelo 78100-00D, Labconco, Kansas City, MO, EUA). Posteriormente, as frações foram submetidas à análise de aminoácidos. O cálculo da ACF foi realizado por meio de fórmulas desenvolvidas por Silvestre, Hamon e Yvon (1994b), após a multidetecção das frações a 230nm, 280nm e 300nm, 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 (BARBOSA et al., 2004; CARREIRA et al., 2004; DELVIVO et al., 2006; LOPES; DELVIVO; SILVESTRE, 2005; MORAIS et al., 2005; MORATO et al., 2000; SILVA et al., 2007; SILVESTRE et al., 1994b; SOARES et al., 2006).

Análise estatística

Todos os experimentos foram feitos em 3 repetições e as análises realizadas em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância e para a avaliação das diferenças entre as médias dos teores de peptídios e aminoácidos livres das frações cromatográficas dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite foi utilizado o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$) (PIMENTEL-GOMES, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CONCENTRADO PROTEICO DO SORO DE LEITE

Observa-se, na tabela 2, que os teores obtidos para proteínas, cinzas totais e lactose estão próximos aos encontrados por outros autores (MORTENSON; VICKERS; REINECCIUS, 2008; SAMMEL; CLAUS, 2003). Além disso, o teor de umidade está de acordo com a ficha técnica do produto que informa apenas sobre este valor (> 5g%), porém é bem superior aos obtidos pelos autores citados acima.

Tabela 2 – Composição química do concentrado proteico do soro de leite

Componentes	¹ Valores obtidos (g%)	CPS 1 (g%)	CPS 2 (g%)	CPS 3 (g%)
Proteínas	35,8	---	34,5	38,6
Umidade	8,38	> 5	3,5	2,4
Lipídios	0,05	---	3,5	2,8
Cinzas totais	5,30	---	6,4	6,5
Lactose	50,18	---	52,1	49,8

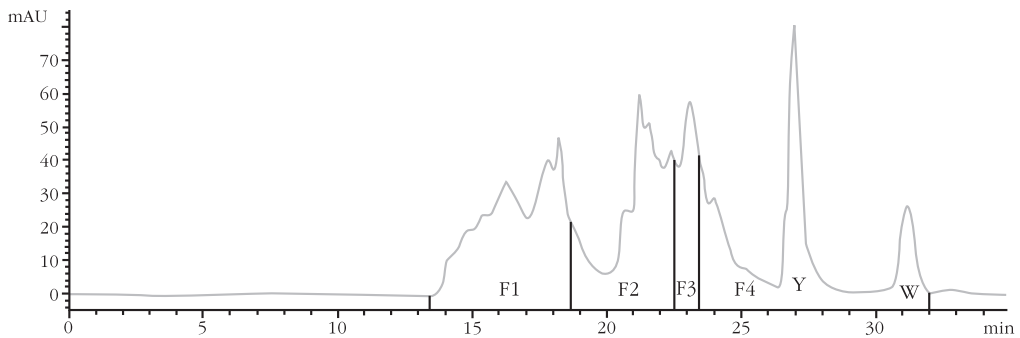
¹Valores encontrados após análise do concentrado proteico do soro de leite utilizado no experimento (KERRYLAC 750, Kerry do Brasil Ltda, MG, Brasil). CPS 1 - Valores disponibilizados na ficha técnica do produto KERRYLAC 750 da Kerry do Brasil Ltda (Três Corações, MG, Brasil); CPS 2 - Valores encontrados por SAMMEL e CLAUS, 2003 analisando o CPS Foremost 365 (Foremost Farms, Baraboo, WI, USA). CPS 3 – Valores encontrados por Mortenson, Vickers e Reineccius (2008).

Por outro lado, a quantidade de lípidos aqui encontrada é muito menor do que a reportada na literatura (MORTENSON; VICKERS; REINECCIUS, 2008; SAMMEL; CLAUS, 2003). Estas diferenças devem estar relacionadas, principalmente, às variações da matéria-prima utilizada bem como aos processos industriais de obtenção do CPS.

CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS DO CONCENTRADO PROTEICO DO SORO DE LEITE

Perfil peptídico dos hidrolisados proteicos

Os hidrolisados proteicos foram separados em quatro frações (F1, F2, F3 e F4), conforme descrito, anteriormente, em diversos trabalhos realizados no mesmo laboratório do presente estudo (BIASUTTI et al., 2007; CARREIRA et al., 2004; DELVIVO et al., 2006; LOPES; DELVIVO; SILVESTRE, 2005; MORAIS et al., 2005; MORATO et al., 2000; SILVA et al., 2007; SILVESTRE; HAMON; YVON, 1994b; SOARES et al., 2006). A fração F1 corresponde aos peptídios com mais de 7 resíduos de aminoácidos, a fração F2 aos peptídios médios contendo de 4 a 7 resíduos de aminoácidos, a fração F3 contém os di-tripeptídios e a fração F4 os aminoácidos livres. A título de exemplo, o perfil cromatográfico do hidrolisado S1, a 230nm, está apresentado na figura 1.



F1: grandes peptídios (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di-tripeptídios; F4: aminoácidos livres. Y = pico da tirosina, W = pico do triptofano. Hidrolisado S1: matéria-prima a 10%; tempo de hidrólise = 5 h; relação E:S = 1:100.

Figura 1 – Perfil cromatográfico do hidrolisado S1 a 230nm

A técnica de SE-HPLC, utilizada no presente trabalho, foi eficiente na caracterização de hidrolisados proteicos, especialmente quando o interesse está voltado para o fracionamento de peptídios com massas moleculares pequenas, ou seja, inferiores a 1000 Da. 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 (BIASUTTI et al., 2007; DELVIVO et al., 2006; SILVA et al., 2007) e outras fontes proteicas como caseína (BARBOSA et al., 2004; CARREIRA et al., 2004; MORAIS et al., 2005; MORATO et al., 2000), leite (LOPES; DELVIVO; SILVESTRE, 2006) e arroz (BIZZOTTO et al., 2006).

Na literatura, são encontradas diversas técnicas para o fracionamento dos peptídios de hidrolisados proteicos, como por exemplo, eletroforese em gel de poliácridamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (CHICÓN et al., 2009), cromatografia de exclusão molecular (SEC) (LI-JUN; CHUAN-HE; ZHENG, 2007), cromatografia líquida de alta velocidade com eletrospray acoplado ao espectrômetro de massa (LI-JUN; CHUAN-HE; ZHENG, 2007), HPLC capilar (ITO et al., 2005), HPLC de fase reversa (NOGUEIRA; LÄMMERHOFER; LINDNER, 2005), 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; KATAEVA; AKIMENKO, 1992; VISSER; SLAGEN; ROBBEN, 1992), Cromatografia rápida de fase líquida de proteína (Fast protein liquid chromatography - FPLC) (JE et al., 2007) e Foco Isoelétrico em Fase Líquida (SAINT-SAUVEUR et al., 2008).

Entretanto, ao contrário da técnica aqui utilizada a maioria destes métodos apresenta uma série de inconvenientes. Assim, Lemieux et al. (1991), empregando a SE-HPLC com uma coluna TSK G-2000 SW, relataram a dificuldade de separar os peptídios de acordo com o tamanho da cadeia, tendo observado uma superposição de compostos com pesos moleculares diferentes. De acordo com Nogueira, Lämmerhofer e Lindner (2005), na HPLC

de fase reversa há sobreposição de peptídios e impureza nos picos. Além disso, também pode ocorrer sobrecarga de peptídios básicos tanto na HPLC de fase reversa quanto na HPLC capilar (McCALLEY, 2004).

Golovchenko, Katalva e Akimenko (1992) e Visser, Slogen e Robben (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.

Dois métodos cromatográficos (exclusão molecular em coluna Sephadex G25 e cromatografia líquida de alta velocidade com eletro spray acoplado ao espectrômetro de massa) foram empregados por Li-Jun, Quan-He e Zheng (2007) para avaliar a distribuição de tamanho molecular de peptídios obtidos de soro de leite pela ação de uma protease alcalina (alcalase). Entretanto, estes métodos não foram capazes de fracionar os peptídios de acordo com o tamanho da cadeia, especialmente os pequenos peptídios. Segundo os autores, apenas a faixa de peso molecular foi evidenciada, indo de 600 a 1400Da e de 300 a 1300Da, para o primeiro e o segundo método, respectivamente.

Saint-Sauveur et al. (2008) avaliaram as propriedades imunomoduladoras de peptídios obtidos da hidrólise das proteínas isoladas do soro de leite com uso de tripsina e quimotripsina. Entretanto, o método analítico utilizado por estes autores para caracterizar o perfil peptídico (fracionamento por Foco Isoelétrico em Fase Líquida e quantificação por Cromatografia Líquida de Exclusão Molecular) separa os peptídios obtidos nas seguintes frações: maiores que 10kDa, entre 5 e 10kDa, entre 2 e 5kDa e menores que 2kDa, não sendo eficiente para avaliação do conteúdo de di-tripeptídios.

Teor de peptídios e aminoácidos livres dos hidrolisados

Observa-se, na tabela 3, que para alguns hidrolisados, a distribuição de peptídios foi semelhante, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os teores de peptídios e de aminoácidos livres. Este é o caso observado quando se compara S2 com S4, S2 com S5; S7 com S8; S10, S11 e S14 entre si e S12, S15 e S18, entre si.

Para a escolha do hidrolisado que apresentou o melhor perfil peptídico, do ponto de vista nutricional, as ponderações de alguns autores devem ser consideradas. Assim, segundo Frenhani e Burini (1999), durante o metabolismo de proteínas, o primeiro estágio de hidrólise leva à formação de oligopeptídios contendo de 2 a 6 resíduos de aminoácidos e aminoácidos livres. Estes peptídios são, então, quebrados em di-tripeptídios e, finalmente, as proteínas são absorvidas na forma de di-tripeptídios e de aminoácidos livres. Ainda, de acordo com estes mesmos autores os di-tripeptídios são mais eficientemente absorvidos que os aminoácidos livres, os quais, por sua vez, são melhores que os tetra- ou peptídios superiores. Em quantidades equivalentes de di-tripeptídios e misturas de aminoácidos livres, os di-tripeptídios apresentam velocidade de absorção aproximadamente 10 vezes maior. González-Tello et al. (1994) também relatam as vantagens dos di-tripeptídios sobre os aminoácidos livres por apresentarem maior velocidade de absorção.

Tabela 3 – Teor de peptídios e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite obtidos pela ação da subtilisina

Hidrolisados	F1 (> 7)	F2 (4-6)	F3 (2-3)	F4 (AA Livres)
Comercial	39,01 ^{i/1}	41,16 ^{a/1}	5,90 ^{cdef/4}	13,95 ^{i/3}
S1	51,91 ^{b/1}	19,49 ^{hi/3}	6,51 ^{bcde/4}	22,08 ^{fgh/2}
S2	49,29 ^{cd/1}	21,18 ^{fgh/3}	6,18 ^{bcdef/4}	23,34 ^{ef/2}
S3	12,28 ^{i/3}	28,8 ^{b/2}	13,34 ^{a/3}	45,56 ^{a/1}
S4	47,43 ^{de/1}	23,10 ^{def/2}	5,19 ^{ef/3}	24,26 ^{de/2}
S5	49,63 ^{c/1}	22,67 ^{def/2}	4,14 ^{f/3}	23,54 ^{ef/2}
S6	29,70 ^{j/2}	16,73 ^{i/3}	8,15 ^{b/4}	45,40 ^{a/1}
S7	51,18 ^{bc/1}	18,78 ^{i/3}	5,06 ^{ef/4}	24,96 ^{cde/2}
S8	51,66 ^{bc/1}	18,00 ^{ij/3}	5,51 ^{def/4}	24,81 ^{cde/2}
S9	59,93 ^{a/1}	19,79 ^{ghi/2}	6,02 ^{bcdef/4}	14,24 ^{i/3}
S10	50,13 ^{bc/1}	21,99 ^{def/2}	7,89 ^{bc/4}	19,97 ^{i/3}
S11	48,28 ^{cde/1}	22,65 ^{def/2}	7,80 ^{bc/3}	21,25 ^{ghi/2}
S12	43,36 ^{gh/1}	23,92 ^{cde/2}	6,43 ^{bcde/3}	26,27 ^{cd/2}
S13	47,1 ^{ef/1}	14,33 ^{k/3}	5,80 ^{cdef/4}	29,75 ^{b/2}
S14	50,29 ^{bc/1}	21,77 ^{efg/2}	7,71 ^{bcd/3}	20,21 ^{hi/2}
S15	43,82 ^{gh/1}	23,34 ^{def/3}	6,82 ^{bcde/4}	26,00 ^{cd/2}
S16	44,50 ^{fg/1}	25,79 ^{c/2}	6,62 ^{bcde/4}	23,07 ^{efg/3}
S17	38,01 ^{i/1}	24,15 ^{cd/3}	6,6 ^{bcde/4}	31,22 ^{b/2}
S18	42,01 ^{h/1}	23,57 ^{de/3}	7,56 ^{bcd/4}	26,84 ^{c/2}

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).

Desta maneira, conclui-se que o melhor perfil peptídico foi obtido para o hidrolisado S3, pois apresentou maior quantidade de di-tripeptídios (13,34%), um dos maiores teores de aminoácidos livres (45,56%) e o menor de grandes peptídios (12,28%), quando comparado ao hidrolisado de CPS comercial o qual apresenta teores de grandes peptídios de 39,01%, di-tripeptídios 5,90% e aminoácidos livres 13,95%.

Os resultados do presente trabalho foram comparados com os obtidos no mesmo laboratório, assim como com os de outros autores, para os quais a hidrólise das proteínas do leite ou do soro de leite foi realizada empregando-se uma subtilisina.

Em trabalho realizado, anteriormente, no mesmo laboratório, empregando-se a mesma enzima do presente estudo para hidrolisar o soro de leite em pó, o melhor

perfil peptídico obtido foi inferior ao do S3, principalmente com relação aos teores de aminoácidos livres (35,29%) e de grandes peptídios (22,91%). Além disso, a quantidade de di-tripeptídios foi um pouco inferior (10,89%) (BIASUTTI et al., 2007).

A ação da subtilisina (Carlsberg, P5380, Sigma) sobre o perfil peptídico de hidrolisados de outras proteínas lácteas foi, igualmente, estudada neste mesmo laboratório, utilizando-se a caseína como substrato proteico (MORATO et al., 2000). Neste caso, o melhor perfil peptídico obtido foi superior ao do S3 em termos de di-tripeptídios (23%). Por outro lado, apresentou desvantagem em relação ao S3 quanto aos teores de aminoácidos livres (16%) e de grandes peptídios (29%). Ressalta-se, ainda, que neste trabalho com a caseína, foi utilizada uma concentração de matéria-prima (0,125%) cerca de 270 vezes menor que a empregada no presente estudo, o que elevaria em demasia os custos de adaptação para larga escala, relacionados à secagem do produto.

Outros autores (LOOSEN et al., 1991) utilizaram a subtilisina Carlsberg, (P5380, Sigma) para hidrolisar a caseína e obtiveram de 75 a 85% de di-tripeptídios. Entretanto, este valor elevado foi encontrado após o emprego da ultrafiltração. Ainda, o método empregado por estes autores para avaliação do perfil peptídico (cromatografia de troca de ligante de alta performance sobre sílica recoberta com cobre) é inferior ao utilizado no presente trabalho, uma vez que dosa diretamente apenas os aminoácidos livres e os dipeptídios não básicos, sendo os tripeptídios determinados indiretamente.

COMPARAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS

Considerando que não foram encontrados na literatura dados de outros autores abordando o efeito dos parâmetros na hidrólise do soro de leite, o trabalho de Biasutti et al. (2007), realizado no mesmo laboratório do presente estudo e utilizando a mesma subtilisina (Protamax N200) para hidrólise das proteínas do soro de leite em pó, foi a principal referência adotada para comparação de resultados com o presente trabalho.

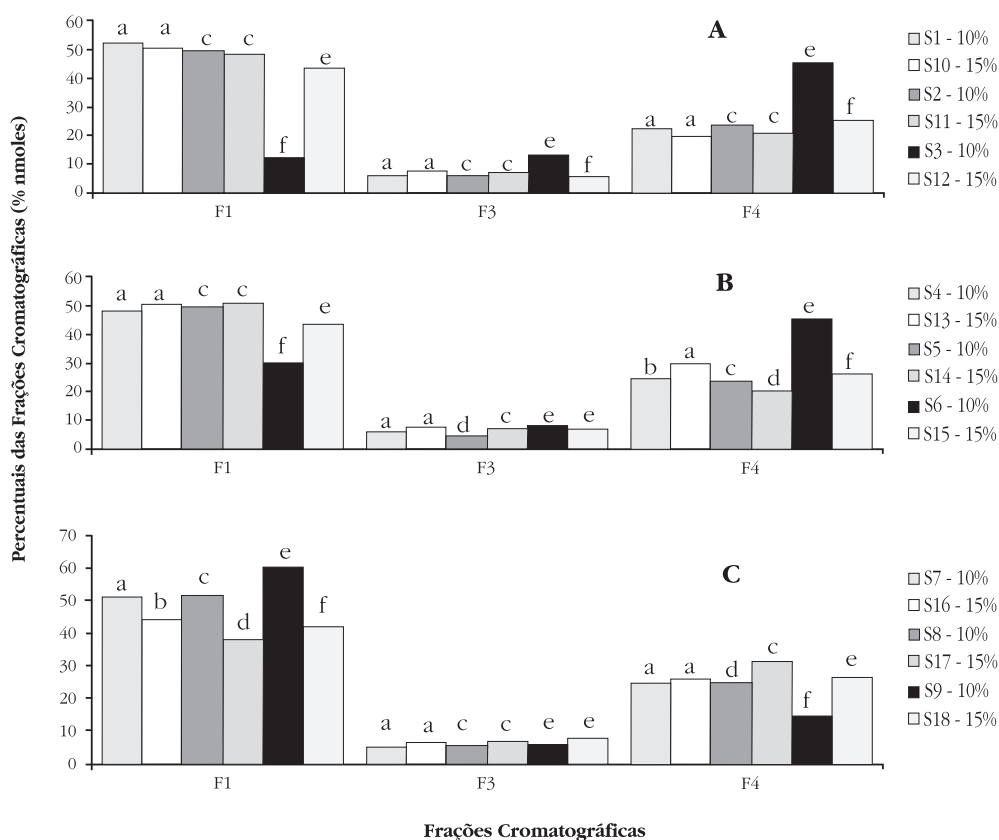
Ainda, resultados da literatura abordando o efeito dos parâmetros hidrolíticos empregados na ação da subtilisina sobre a caseína foram, do mesmo modo, utilizados para comparação com os dados aqui obtidos, apesar de nestes estudos o efeito da concentração da matéria-prima não ter sido avaliada.

Para a análise de todos os parâmetros utilizados neste trabalho, levou-se em consideração a redução de custos do processo para adaptação do mesmo à produção em larga escala. Assim, o aumento da concentração inicial da matéria-prima está associado à redução do volume de produto a ser desidratado e, conseqüentemente, tempo e investimento despendido no processo de secagem; a redução da relação E:S está associada ao emprego de menor quantidade de enzima necessária à hidrólise; a diminuição do tempo de reação está relacionada à redução do risco de contaminação bacteriana e menor probabilidade de formação de produtos de degradação, além de menor consumo de energia.

Efeito da concentração da matéria-prima

Para analisar o efeito da concentração inicial do CPS sobre o perfil peptídico dos hidrolisados, devem ser comparadas as seguintes amostras: 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 2, estão apresentados três destes grupos. Observa-se, na figura 2, que a vantagem de utilização de uma maior concentração de matéria-prima ocorreu em vários casos e relaciona-se com a obtenção de um maior teor de di-tripeptídios (S5 - 10% com S14 - 15%) e de aminoácidos livres (S4 - 10% com S13 - 15%; S8 - 10% com S17 - 15%; S9 - 10% com S18 - 15%), além de menor teor de grandes peptídios (S7 - 10% com S16 - 15%; S8 - 10% com S17 - 15%; S9 - 10% com S18 - 15%).



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 peptídios (> 7 resíduos de aminoácidos); F3: di-tripeptídios (2 e 3 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.

Figura 2 – Efeito da concentração da matéria-prima sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite

Em trabalho realizado, anteriormente, no mesmo laboratório, utilizando-se a mesma subtilisina para hidrolisar o soro de leite em pó, também foi observado este mesmo efeito vantajoso da utilização de uma maior concentração de matéria-prima (10% para 15%), porém em um número menor de casos, especialmente no que se refere à obtenção de maior teor de di-tripeptídios (apenas 2 casos), maior teor de aminoácidos livres (dois casos) e menor teor de grandes peptídios (dois casos).

Efeito da relação E:S

A influência da relação E:S no processo de hidrólise das proteínas do CPS pela subtilisina pode ser avaliada na figura 3. Com o 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 3, estão apresentados dois destes grupos.

Observa-se, na figura 3, que a utilização de uma menor relação E:S foi vantajosa para vários casos, uma vez que se obteve menor teor de grandes peptídios (S9 - 4:100 com S8 - 2:100; S9 - 4:100 com S7 - 1:100; S14 - 2:100 com S13 - 1:100 e S18 - 4:100 com S17 - 2:100) e maior teor de aminoácidos livres (S9 - 4:100 com S8 - 2:100; S9 - 4:100 com S7 - 1:100; S15 - 4:100 com S13 - 1:100; S14 - 2:100 com S13 - 1:100 e S18 - 4:100 com S17 - 2:100). Por outro lado, a utilização de uma menor relação E:S não afetou o teor de di-tripeptídios na maioria dos casos ou observou-se menor teor desta fração em quatro casos (S3 - 4:100 com S2 - 2:100; S3 - 4:100 com S1 - 1:100; S6 - 4:100 com S5 - 2:100 e S6 - 4:100 com S4 - 1:100).

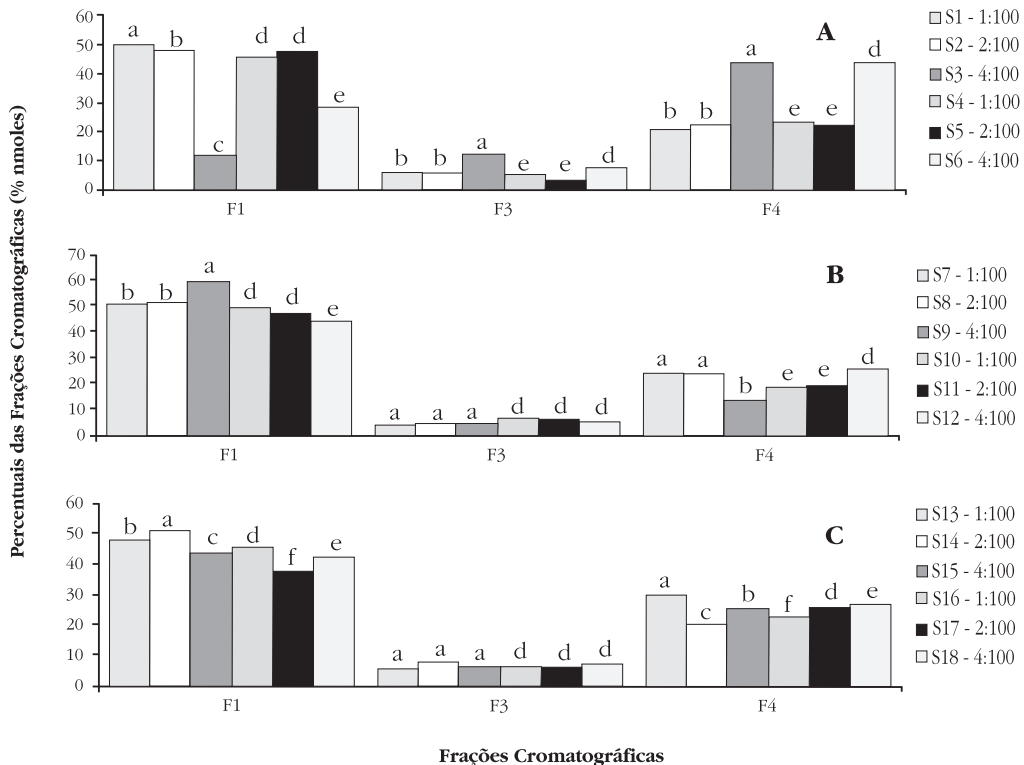
A utilização de uma menor relação E:S nos trabalhos realizados por Biasutti et al. (2007), no mesmo laboratório do presente estudo, na hidrólise das proteínas do soro de leite em pó também demonstrou efeito benéfico, entretanto, em apenas um caso relacionado à obtenção de maior teor de di-tripeptídios, um caso com maior teor de aminoácidos livres e em dois casos com menor teor de grandes peptídios.

Ademais, Morato et al. (2000), em estudo realizado anteriormente no mesmo laboratório, observaram que a utilização de uma menor relação E:S (4:100 para 2:100), na ação da subtilisina sobre a caseína, promoveu a obtenção de um maior teor de aminoácidos livres (4% para 16%), mas por outro lado, obteve-se maior teor de grandes peptídios (14% para 30%).

Efeito do tempo de hidrólise

A figura 4 demonstra a influência do tempo de hidrólise da enzima proteolítica (subtilisina) sobre o CPS.

Com intuito de manter os demais parâmetros constantes e de maneira análoga ao processo comparativo realizado para estudar o efeito da relação E:S, 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 figura 4, estão apresentados dois destes grupos.



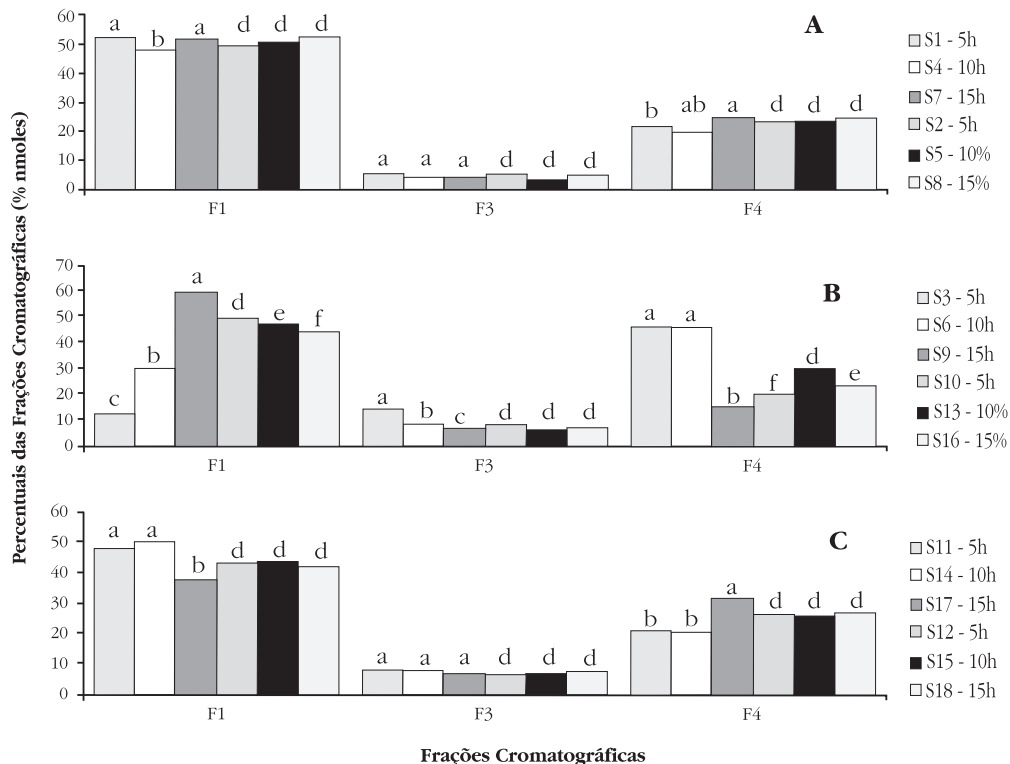
Relações E:S utilizadas: 1:100 (S1, S4, S7, S10, S13, S16), 2:100 (S2, S5, S8, S11, S14, S17) e 4:100 (S3, S6, S9, S12, S15, S18) F1: grandes peptídios (> 7 resíduos de aminoácidos); F3: di-tripeptídios (2 e 3 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. 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.

Figura 3 – Efeito da relação E:S sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite

Verifica-se, na figura 4, que a utilização de um menor tempo de hidrólise foi vantajosa uma vez que, para vários casos obteve-se um menor teor de grandes peptídios (S7 – 15h com S4 - 10h; S9 - 15h com S6 - 10h; S9 - 15h com S3 - 5h e S6 - 10h com S3 – 5h), um maior de di-tripeptídios (S6 - 10h com S3 - 5h e S9 - 15h com S3 - 5h) e, em três casos, um maior teor de aminoácidos livres (S9 - 15h com S6 - 10h; S9 - 15h com S3 - 5h e S16 - 15h com S13 - 10h).

No trabalho realizado por Biasutti et al. (2007) neste mesmo laboratório, foi observado que o efeito benéfico devido à utilização de um menor tempo de hidrólise para ação da subtilisina sobre as proteínas do soro de leite em pó ocorreu sempre em quatro casos, tanto para os relacionados à obtenção de maior teor de di-tripeptídios (10h com 5h e 15h com 5h; 15h com 10h e 15h com 5h), quanto para aqueles em que se obteve maior teor

de aminoácidos livres (15h com 5h e 10h com 5h; 15h com 10h e 15h com 5h) e menor de grandes peptídios (15h com 5h e 10h com 5h; 10h com 5h; 15h com 5h e 10h com 5h; 15h com 10h e 15h com 5h).



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 peptídios (> 7 resíduos de aminoácidos); F3: di-tripeptídios (2 e 3 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.

Figura 4 – Efeito do tempo de hidrólise sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite

CONCLUSÕES

A utilização da subtilisina nas reações de hidrólise das proteínas do concentrado proteico do soro de leite mostrou-se eficiente, uma vez que permitiu a obtenção de hidrolisados proteicos ricos em di-tripeptídios e aminoácidos livres. Considerando-se como preferenciais os resultados favoráveis à aplicação do processo desenvolvido à produção em larga escala, o efeito da alteração dos parâmetros hidrolíticos foi benéfico em vários hidrolisados analisados. O melhor perfil peptídico encontrado foi obtido pelo emprego

de uma de concentração inicial de matéria-prima de 10%, E:S de 4:100 e 5 h de hidrólise, caracterizado pelo elevado teor de di-tripeptídios (13,34%) e de aminoácidos livres (45,56%), assim como pela pequena porcentagem de grandes peptídios (12,28%), quando comparado ao hidrolisado comercial.

REFERÊNCIAS/REFERENCES

- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis of AOAC International*. 16th ed. Arlington: AOAC International, 1995. 2 v.
- AOYAMA, T.; FUKUI, K.; TAKAMATSU, K.; HASHIMOTO, Y.; YAMAMOTO, T. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (Yellow KK). *Nutrition*, v. 16, n. 6, p. 349-354, 2000.
- 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.
- BEYNON, R. J.; BOND, J. S. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 1989. 278 p.
- BIASUTTI, E. A. R.; LOPES, D. C. F.; SOUZA, M. W. S.; CAMPOS, R. B. D.; SEGALL, S. D.; SILVESTRE, M. P. C. Obtenção de hidrolisados do soro de leite com alto teor de oligopeptídios utilizando-se *subtilisina*. *Braz. J. Food Technol.*, v. 10, n. 4, p. 225-232, 2007.
- BIZZOTTO, C. S.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E. A. R.; SILVA, V. D. M.; JUNQUEIRA, R. G.; SILVESTRE, M. P. C. Hidrolisados proteicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da corolase pp e uso do carvão ativado. *Ciênc. Agrotecnol.*, v. 30, n. 2, p. 308-316, 2006.
- BOZA, J. J.; MOËNNOZ, D.; VUICHOUD, 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, n. 6, p. 237-243, 2000.
- BRANS, G.; SCHRÖEN, C. G. P. H.; VAN DER SMAN, R. G. M.; BOOM, R. M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *J. Memb. Sci.*, v. 243, n. 1-2, p. 263-272, 2004.
- 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.
- CHICÓN, R.; BELLOQUE, J.; ALONSO, E.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. *Food Hydrocolloids*, v. 23, n. 3, p. 593-599, 2009.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 11, n. 7, p. 254-262, 2000.
- 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.
- FRENHANI, P. B.; BURINI, R. B. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídios. *Arq. Gastroenterol.*, v. 36, n. 4, p. 227-237, 1999.
- 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.

- 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.
- ITO, S.; YOSHIOKA, S.; OGATA, I.; YAMASHITA, E.; NAGAI, S.; OKUMOTO, T.; ISHII, K.; ITO, M.; KAJI, H.; TAKAO, K.; DEGUCHI, K. Capillary high-performance liquid chromatography/electrospray ion trap time-of-flight mass spectrometry using a novel nanoflow gradient generator. *J. Chromatogr. A*, v. 1090, p. 178-183, 2005.
- JE, J. Y.; QIAN, Z. J.; BYUN, H. G.; KIM, S. K. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Proc. Biochem.*, v. 42, n. 5, p. 840-846, 2007.
- 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, n. 11-12, p. 499-504, 1991.
- LI-JUN, L.; CHUAN-HE, Z.; ZHENG, Z. Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. *Food Bioprod. Proc.*, v. 86, n. 1, p. 1-6, 2007.
- 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.
- McCALLEY, D. V. Effect of buffer on peak shape of peptides in reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1038, n. 1-2, p. 77-84, 2004.
- 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. Anal.*, v. 13, n. 5, p. 843-857, 2000.
- MORTENSON, M. A.; VICKERS, Z. M.; REINECCIUS, G. A. Flavor of whey protein concentrates and isolates. *Int. Dairy J.*, v. 18, n. 6, p. 649-657, 2008.
- NIELSEN, S. S. *Food analysis*. Gaithersburg: Aspen Publisher, 1998. 630 p.
- NOGUEIRA, R.; LÄMMERHOFER, M.; LINDNER, W. Alternative high-performance liquid chromatographic peptide separation and purification concept using a new mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange type stationary phase. *J. Chromatogr. A*, v. 1089, n. 1-2, p. 158-169, 2005.
- PALLAS, M. C. *Importancia de la nutrición en la persona de edad avanzada*. Barcelona: Novartis Consumer Health, 2002.
- PEREA, A.; UGALDE, U.; RODRIGUEZT, I.; SERRAT, J. L. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: Applications in industrial whey bioconversion processes. *Enz. Microb. Technol.*, v. 15, n. 5, p. 418-423, 1993.
- PIMENTA, F. M. V.; ABECIA-SORIA, M. I.; AULER, F.; AMAYA-FARFAN, J. Physical performance of exercising young rats fed hydrolysed whey protein at a sub-optimal level. *Int. Dairy J.*, v. 16, n. 9, p. 984-991, 2006.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 14ª ed. Piracicaba: Nobel, 2000. 477 p.

- RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microb. Mol. Biol. Rev.*, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.
- REED, G. *Enzymes in food processing*. 2nd ed. London: Academic Press, 1975. 573 p.
- SAINT-SAUVEUR, D.; GAUTHIER, S. F.; BOUTIN, Y.; MONTONI, A. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. *Int. Dairy J.*, v. 18, n. 3, p. 260-270, 2008.
- SAMMEL, L. M.; CLAUS, J. R. Whey protein concentrates effects on pink color development in a cooked ground turkey breast model system. *Meat Sci.*, v. 65, n. 4, p. 1293-1299, 2003.
- SCHIMIDT, D. G.; POLL, J. K. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Netb. Milk Dairy J.*, v. 45, n. 4, p. 225-240, 1991.
- SGARBIERI, V. C. *Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações*. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.
- SILVA, V. D. M.; MARCO, L. M.; AFONSO, W. O.; LOPES, D. C. F.; JANUÁRIO, J. N.; AGUIAR, M. J.; STARLING, A. L. P.; SILVESTRE, M. P. C. Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *Am. J. Food Techn.*, v. 2, n. 5, p. 327-341, 2007.
- 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, n. 1, 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. J. B.; 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.
- 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, n. 1-2, p. 205-209, 1992.
- YUST, M. M.; PEDROCHE, J.; MEGÍAS, C.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Rapeseed protein hydrolysates: a source of HIV protease peptide inhibitors. *Food Chem.*, v. 87, n. 3, p. 387-392, 2004.

Recebido para publicação em 18/06/08.

Aprovado em 23/01/09.