

# Perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico do soro de leite, obtidos pela ação da pancreatina e da papaína

## *Peptide profile of enzymatic hydrolysates from whey protein concentrate obtained by action of pancreatin and papain*

### ABSTRACT

SILVA, M. R.; RODRIGUES, D. F.; LANA, F. C.; SILVA, V. D. M.; MORAIS, H. A.; SILVESTRE, M. P. C. Peptide profile of enzymatic hydrolysates from whey protein concentrate obtained by action of pancreatin and papain. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* = J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP, v. 35, n. 3, p. 97-114, dez. 2010.

*The aim of this study was to obtain enzymatic hydrolysates from whey protein concentrate with high oligopeptide, especially di- and tripeptides, and free amino acid contents, besides small amounts of large peptides. Different parameters were evaluated such as type of enzyme (pancreatin and papain), enzyme:substrate ratio (0.5:100, 1:100, 2:100 and 3:100), and the use of ultrafiltration. The peptide profiles of the hydrolysates were characterized by using a fractionation method by size-exclusion HPLC followed by a rapid Corrected Fraction Area method for quantifying the components of the chromatographic fractions. The results showed that, in terms of number of analyzed samples, the pancreatin action was more advantageous than papain. However, the best peptide profile was obtained by papain, reaching 15.29% of di- and tripeptides, 47.83% of free amino acids and 25.73% of large peptides. The use of the smallest enzyme:substrate ratio (0.5:100) was beneficial in some cases for both enzymes, while the lack of ultrafiltration was favorable just for pancreatin.*

**Keywords:** Whey Protein Concentrate.  
**Enzyme:Substrate Ratio. Enzymatic Hydrolysis.**  
**Ultrafiltration. Peptide Profile.**

MAURO RAMALHO SILVA<sup>1</sup>;  
DÉBORA FERNANDES  
RODRIGUES<sup>1</sup>; FLÁVIA DE  
CARVALHO LANA<sup>1</sup>; VIVIANE  
DIAS MEDEIROS SILVA<sup>1</sup>;  
HARRIMAN ALEY MORAIS<sup>2</sup>;  
MARIALICE PINTO  
COELHO SILVESTRE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia,  
Universidade Federal de  
Minas Gerais (UFMG)

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências  
Biológicas e da Saúde,  
Universidade Federal  
dos Vales do Jequitinhonha  
e Mucuri (UFVJM)

**Endereço para  
correspondência:**

Marialice Pinto  
Coelho Silvestre  
Faculdade de Farmácia,  
Universidade Federal de  
Minas Gerais  
Av. Antônio Carlos,  
6627 - Sala 4132  
Bloco 4 - CEP 31270-901  
Belo Horizonte, MG, Brasil.

E-mail:  
malice@farmacia.ufmg.br

**Agradecimentos:**  
os autores agradecem  
à CAPES, ao CNPq  
e à FAPEMIG,  
pelo apoio financeiro.

## RESUMEN

*El objetivo de este trabajo fue obtener hidrolizados enzimáticos a partir de concentrado proteico de suero lácteo con elevados contenidos de oligopéptidos, especialmente di y tri péptidos, y aminoácidos libres, además de reducida cantidad de grandes péptidos. Para eso fueron evaluados algunos parámetros como el tipo de enzima (pancreatina o papaína), la relación enzima:substrato (0,5:100, 1:100, 2:100 y 3:100) y el empleo de ultrafiltración. Para evaluar el perfil peptídico, los hidrolizados se sometieron a fraccionamiento en cromatografía líquida de alta eficiencia de exclusión molecular (SE-HPLC) y para la cuantificación de los componentes de las fracciones de la cromatografía fue utilizado el método del Área Corregida de la Fracción (ACF). Los resultados indican que el uso de pancreatina fue más ventajoso que el de papaína, así como la menor relación enzima:substrato (0,5:100). Por otro lado, el mejor perfil peptídico (15,29% de di y tri péptidos, 47,83% de aminoácidos libres y 25,73% de grandes péptidos) fue conseguido con el empleo de papaína. La menor relación enzima:substrato (0,5:100) fue favorable en algunos casos para las dos enzimas. La ausencia de ultrafiltración favoreció los hidrolizados producidos con pancreatina.*

**Palabras clave:** Concentrado proteico de lactosuero. Relación enzima:substrato. Hidrólisis enzimática. Ultrafiltración. Perfil peptídico.

## RESUMO

*O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de hidrolizados enzimáticos do concentrado proteico do soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos, principalmente di- e tripeptídeos, e de aminoácidos livres, além de quantidade reduzida de grandes peptídeos. Para tal, foram avaliados diferentes parâmetros, como tipo de enzima (pancreatina e papaína), relação enzima:substrato (0,5:100, 1:100, 2:100 e 3:100) e o emprego da ultrafiltração. 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. Os resultados obtidos indicaram que, em termos de número de casos analisados, a ação da pancreatina foi mais vantajosa do que a da papaína. Entretanto, o melhor perfil peptídico foi obtido pela ação da papaína, dando origem a 15,29% de di- e tripeptídeos, 47,83% de aminoácidos livres e 25,73% de grandes peptídeos. A utilização da menor relação enzima:substrato (0,5:100) foi benéfica em alguns casos para ambas as enzimas, enquanto que a ausência da ultrafiltração mostrou-se favorável apenas para a pancreatina.*

**Palavras-chave:** Concentrado proteico do soro de leite. Relação enzima:substrato. Hidrólise enzimática. Ultrafiltração. Perfil peptídico.

## INTRODUÇÃO

O concentrado proteico do soro de leite (WPC – *Whey Protein Concentrate*), produto originado da separação em membranas das proteínas do soro de leite, contém de 35 a 80% de proteínas, o que contribui para agregar valor ao soro de leite. Ressalta-se, ainda, sua maior estabilidade e conservação das características físico-químicas dos componentes, além da facilidade de manipulação laboratorial (BRANS et al., 2004).

Diversas aplicações estão associadas ao WPC, devido às excelentes propriedades funcionais destas proteínas, sendo um ingrediente amplamente utilizado na indústria de alimentos em uma grande variedade de produtos como cárneos, bebidas, produtos de padaria e formulações infantis (BRANS et al., 2004).

A hidrólise enzimática tem sido utilizada na melhoria das propriedades funcionais e nutricionais das proteínas, influenciando principalmente as características de absorção proteica. Assim, vários estudos têm demonstrado que formulações contendo elevado teor de oligopeptídeos, principalmente di- e tripeptídeos provenientes da hidrólise enzimática de proteínas, são absorvidos mais efetivamente do que a proteína intacta ou uma mistura equivalente de aminoácidos livres, apresentando, assim, um maior valor nutritivo (FRENHANI; BURINI, 1999; HINSBERGER; SANDHU, 2004).

Nesse sentido, hidrolisados proteicos vêm sendo utilizados na prática clínica com finalidades terapêuticas relacionadas à manutenção do estado nutricional de indivíduos que apresentam necessidades nutricionais e/ou fisiológicas não cobertas pela alimentação convencional. Estes hidrolisados têm sido empregados na fabricação de alimentos especiais para diversos grupos, tais como recém-nascidos prematuros, crianças com diarreia, gastroenterite, má-absorção (BIZZOTTO et al., 2006), suplementação para idosos (AFONSO et al., 2009), nutrição de esportistas (ROGERO; TIRAPEGUI, 2008), e pessoas com alergia a proteínas (LI-JUN et al., 2008).

A avaliação da qualidade dos hidrolisados proteicos envolve a determinação dos teores de peptídeos obtidos durante o processo hidrolítico. Neste sentido, algumas técnicas cromatográficas têm sido descritas na literatura, entretanto, estes métodos apresentam vários inconvenientes associados às interações entre o soluto e a fase estacionária e a ineficiência em separar os pequenos peptídeos (NOGUEIRA; LÄMMERHOFER; LINDNER, 2005; LI-JUN; CHUAN-HE; ZHENG, 2008).

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

Este trabalho teve como objetivo a obtenção de hidrolisados enzimáticos de WPC com elevado teor de oligopeptídeos, principalmente di- e tripeptídeos,

e de aminoácidos livres, assim como quantidade reduzida de grandes peptídeos, avaliando-se o efeito de diversos parâmetros como tipo de enzima, relação E:S e o emprego da ultrafiltração.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **MATERIAL**

O concentrado proteico de soro de leite (WPC - *Whey Protein Concentrate*) na forma de pó (Kerrylac 750) foi doado pela Kerry do Brasil Ltda (Três Corações, MG, Brasil). A pancreatina (Corolase PP), EC 3.4.21.4, atividade 34,71 U.mL<sup>-1</sup> e a papaína (Corolase L10), EC 3.4.22.2, atividade 31,56U.mL<sup>-1</sup> foram doadas pela AB Enzymes® (Barueri, SP, Brasil). O ácido fórmico foi adquirido da Merck (Whitehouse Station, NJ, EUA); a bomba peristáltica foi obtida da Millan (Colombo, PR, Brasil); as membranas de fluoreto de polivinilideno para filtração das amostras (0,22µm) e dos solventes (0,45µm), assim como o sistema de fluxo tangencial com porosidade de corte para peso molecular de 10KDa foram adquiridos da Millipore (São Paulo, SP, Brasil). Todos os demais reagentes empregados neste trabalho eram de grau analítico.

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 200 Å (PolylC, Columbia, MD, EUA), uma bomba isocrática e um detector espectrofotométrico UV-VIS (série HP 1100, 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).

### **MÉTODOS**

#### **Determinação da composição química do concentrado proteico do soro de leite**

A composição química do concentrado proteico do soro de leite (WPC) foi determinada segundo os métodos descritos na Association of Official Analytical Chemists (1995). A umidade foi determinada pelo método de secagem em estufa ventilada (Quimis Q-314M242, série 020, Diadema, SP, Brasil) a 105°C até peso constante; as cinzas, por incineração, em mufla (MDS, Fornitec, São Paulo, SP, Brasil) a 550°C; os lipídeos, por extração com éter etílico (Soxhlet modificado, Quimis Q-308G26, série 018, Diadema, SP, Brasil); as proteínas foram determinadas pelo método de micro-Kjeldahl (bloco digestor modelo MA4025 e destilador de nitrogênio modelo MA036, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). A lactose foi quantificada por determinação de glicídios redutores em lactose. O fator de conversão de nitrogênio para proteína usado foi 6,38 (NIELSEN, 1998).

## Preparo dos hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico do soro de leite

Foram preparados dezesseis hidrolisados enzimáticos, variando-se os seguintes parâmetros: tipo de enzima, relação enzima:substrato (E:S) e o emprego da ultrafiltração. As condições empregadas no preparo destes hidrolisados estão apresentadas na tabela 1.

**Tabela 1 - Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite**

Hidrolisados	Tipo de enzima	E:S	Ultrafiltração
H1	Pancreatina	0,5:100	Não
H2	Pancreatina	0,5:100	Sim
H3	Pancreatina	1:100	Não
H4	Pancreatina	1:100	Sim
H5	Pancreatina	2:100	Não
H6	Pancreatina	2:100	Sim
H7	Pancreatina	3:100	Não
H8	Pancreatina	3:100	Sim
H9	Papaína	0,5:100	Não
H10	Papaína	0,5:100	Sim
H11	Papaína	1:100	Não
H12	Papaína	1:100	Sim
H13	Papaína	2:100	Não
H14	Papaína	2:100	Sim
H15	Papaína	3:100	Não
H16	Papaína	3:100	Sim

E:S = relação enzima substrato.

As soluções a 10g% (p/v) de concentrado proteico de soro de leite foram preparadas em água destilada, correspondendo a 3,42% de proteína, sendo o pH ajustado para 7,0 com solução de NaOH a 3mol.L<sup>-1</sup>. Posteriormente, foram aquecidas em banho de vaselina, sob agitação constante em agitador magnético (modelo 752A, Fisatom, São Paulo, SP, Brasil), na temperatura ótima de cada enzima (50°C ou 55°C), seguida da adição de pancreatina ou papaína, respectivamente, para se obter a relação E:S desejada. O tempo total de hidrólise foi de 5 horas e, após este período, as enzimas foram inativadas por aquecimento em banho-

maria a 75°C, por 15 segundos. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas (Freeze Dry System/FreeZone 4,5, model 77500, LABCONCO, Kansas City, MO, EUA).

## **Ultrafiltração dos hidrolisados proteicos**

Algumas amostras dos hidrolisados proteicos (Tabela 1) foram submetidas ao processo de ultrafiltração e diafiltração, utilizando uma quantidade de água equivalente a dez vezes o volume inicial. Para tal, empregou-se um sistema de fluxo tangencial com porosidade de corte para peso molecular de 10KDa e uma bomba peristáltica. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas.

## **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 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 (*Size-Exclusion High Performance Liquid Chromatography* - SE-HPLC) em coluna PHEA, conforme descrito por Silvestre, Hamon e Yvon (1994a). As amostras foram dissolvidas em uma concentração de 1g% (p/v) na fase móvel (ácido fórmico a 0,05mol.L<sup>-1</sup>, pH 2,5), filtradas por meio de membranas de 0,22µm e submetidas à cromatografia à temperatura ambiente, sob condições isocráticas, a um fluxo de 0,5mL.min<sup>-1</sup>, durante 35min, o volume injetado foi de 20µL. A fase móvel foi filtrada, através da membrana de 0,45µm e desgaseificada em ultrassom (modelo T14, Thornton, Vinhedo, SP, Brasil), sob vácuo, por 30 minutos. As frações foram separadas de acordo com o tempo de eluição, sendo F1, de 11,5 a 16,0min (grandes peptídeos, com mais de 7 resíduos de aminoácidos); F2, de 16,0 a 19,5min (peptídeos médios, entre 4 e 7 resíduos); F3, de 19,5 a 20,5min (di- e tripeptídeos); e F4, de 20,5 a 32,0min (aminoácidos livres).

O método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF), desenvolvido por Silvestre, Hamon e Yvon (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) os quais 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 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 (DELVIVO et al., 2006; SILVA et al., 2007; SILVESTRE; HAMON; YVON, 1994b; SOARES et al., 2006).

## Avaliação do efeito de alguns parâmetros

O efeito de alguns parâmetros (tipo de enzima, relação E:S e ultrafiltração) sobre o perfil peptídico dos hidrolisados enzimáticos de WPC foi avaliado. Assim, no preparo destes hidrolisados foram utilizadas duas enzimas (pancreatina e papaína) nas relações E:S de 0,5:100, 1:100, 2:100 e 3:100. Além disso, para cada um destes casos, as amostras foram ou não submetidas ao processo de ultrafiltração.

## Análise estatística

Todos os experimentos e análises foram feitos em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância e, para a avaliação das diferenças entre as médias dos teores de peptídeos 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

A necessidade da determinação da composição química do WPC é relevante, uma vez que esse concentrado representou no presente trabalho, a matéria-prima para o preparo de hidrolisados proteicos.

Observa-se, na tabela 2, que o teor de proteínas é similar aos dois valores encontrados na literatura, enquanto que os resultados de umidade, lipídeos e lactose estão muito próximos aos relatados por Silva et al. (2010), porém diferentes conforme descrito por Afonso et al. (2009) e o teor de cinzas totais foi inferior aos descritos. Ressalta-se, ainda, que o resultado de umidade está de acordo com o citado na ficha técnica do produto, a qual informa apenas sobre este componente ( $> 5$  g%).

**Tabela 2 - Composição química do concentrado proteico do soro de leite**

Componentes	<sup>1</sup> Valores obtidos (g %)	WPC1	WPC2	WPC3
Proteínas	34,23	–	35,8	32,64
Umidade	5,29	>5	8,38	5,06
Lipídeos	0,17	–	0,05	0,15
Cinzas totais	4,74	–	5,30	7,40
Lactose	54,79	–	50,18	54,75

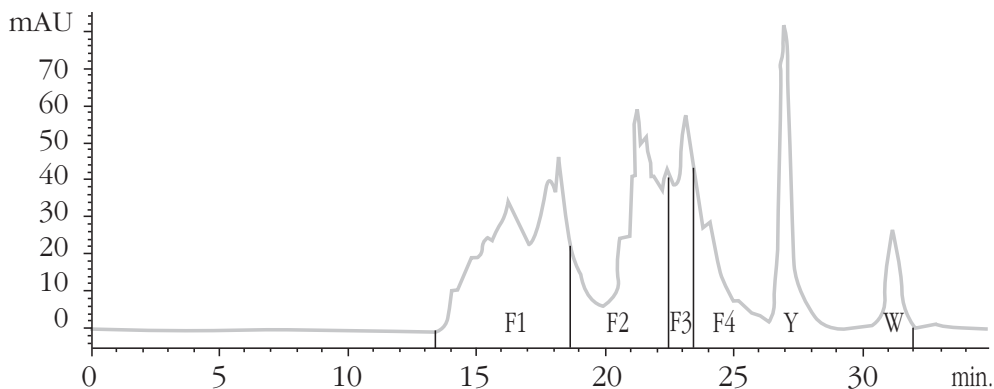
<sup>1</sup>Valores encontrados após análise do concentrado proteico do soro de leite utilizado no experimento (KERRYLAC 750, Kerry do Brasil Ltda, MG, Brasil). WPC 1 - Valores disponibilizados na ficha técnica do produto; WPC 2 e WPC 3 – Valores encontrados por Afonso et al. (2009) e por Silva et al.(2009), respectivamente, analisando o produto citado anteriormente, porém, em lotes diferentes.

Estas diferenças, citadas acima, devem estar relacionadas, principalmente, às variações entre lotes diferentes, 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 presença de infecção da glândula mamária, podem interferir na composição do leite e, conseqüentemente, na do soro (EMBRAPA, 2010).

## CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS DO CONCENTRADO PROTEICO DO SORO DE LEITE

### Perfil peptídico

A técnica de SE-HPLC utilizada foi eficiente na caracterização de hidrolisados proteicos, especialmente com relação ao fracionamento de peptídeos de baixas massas moleculares, ou seja, inferiores a 1000 Da. Assim, os hidrolisados proteicos foram separados em quatro frações (F1, F2, F3 e F4), conforme descrito em diversos trabalhos realizados no mesmo laboratório (DELVIVO et al., 2006; SILVA et al., 2007; SILVESTRE; HAMON; YVON, 1994b; SOARES et al., 2006; SOUZA et al., 2008). 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 H5, a 230nm, está apresentado na figura 1.



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 H5: substrato a 10%; enzima pancreatina, tempo de hidrólise = 5h; relação E:S = 2:100, pH 7.

**Figura 1 – Perfil cromatográfico do hidrolisado H5 a 230nm.**

Na literatura, são encontradas diversas técnicas para o fracionamento dos peptídeos de hidrolisados proteicos, como por exemplo, eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* - SDS-PAGE) (CHICÓN et al., 2009), cromatografia de exclusão molecular (LI-JUN;



CHUAN-HE; ZHENG, 2008), cromatografia líquida de alta velocidade com eletrospray acoplado ao espectrômetro de massa (LI-JUN; CHUAN-HE; ZHENG, 2008), 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 (600 x 7,5mm) (LEMIEUX et al., 1991) e coluna Superose -12HR 10/30 (GOLOVCHENKO; KATAEVA; AKIMENKO, 1992; VISSER; SLAGEN; ROBBEN, 1992), cromatografia líquida rápida 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 utilizada, a maioria destes métodos apresenta uma série de inconvenientes associados à dificuldade de se separar os peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, tendo sido observada sobreposição de peptídeos de tamanhos diferentes e ocorrência de interações eletrostáticas ou hidrofóbicas com a fase estacionária (NOGUEIRA; LÄMMERHOFER; LINDNER, 2005; VISSER et al., 1992).

A metodologia de fracionamento de peptídeos do presente trabalho foi, previamente, utilizada pela mesma equipe para a caracterização do perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos obtidos de diversas fontes protéicas e em condições de reações variadas. Dentre estes estudos, destacam-se os realizados com caseína (BARBOSA et al., 2004; CARREIRA et al., 2004; MORAIS et al., 2005; MORATO et al., 2000), soro de leite (DELVIVO et al., 2006; SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2008), concentrado proteico de soro de leite (AFONSO et al., 2008; AFONSO et al., 2009; SILVA et al., 2010), leite (LOPES; DELVIVO; SILVESTRE, 2005; SOARES et al., 2007) e arroz (LOPES et al., 2008).

### **Teores de peptídeos e de aminoácidos livres**

Observa-se na tabela 3, uma significativa variação do perfil peptídico entre os diferentes hidrolisados enzimáticos do WPC. 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 oligopeptídeos, contendo de 2 a 6 resíduos de aminoácidos, e de aminoácidos livres. Estes peptídeos são, então, quebrados pelas peptidases da borda em escova, com liberação de mais aminoácidos, di- e tripeptídeos (HINSBERGER; SANDHU, 2004). A absorção dos produtos da digestão proteica ocorre por processos complementares, sendo que os aminoácidos podem ser absorvidos tanto na forma livre, por difusão simples ou facilitada (transportadores de membrana), quanto na de di- e tripeptídeos (transportador de oligopeptídeos PepT1) (GILBERT; WONG; WEBB Jr, 2008).

O PepT1 pode potencialmente transportar os milhares de di- e tripeptídeos, que diferem em estrutura, massa molecular, carga elétrica e polaridade (DANIEL; RUBIO-ALIAGA, 2003). Além disso, a absorção pelo PepT1 requer o mesmo gasto que a de um simples AA livre (GILBERT; WONG; WEBB Jr, 2008). Em quantidades equivalentes de di- e tripeptídeos e misturas de aminoácidos livres, os di- e tripeptídeos apresentam velocidade

de absorção aproximadamente 10 vezes maior. GONZÁLEZ-TELLO et al. (1994) também relatam as vantagens dos di- e tripeptídeos sobre os aminoácidos livres por apresentarem maior velocidade de absorção.

**Tabela 3 – Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite**

Hidrolisados	F1 (>7 resíduos de AA)	F2 (4-7 resíduos de AA)	F3 (2-3 resíduos de AA)	F4 (AA livres)
H1	65,9 <sup>4bA</sup>	21,51 <sup>fgB</sup>	2,31 <sup>gD</sup>	10,24 <sup>hC</sup>
H2	39,88 <sup>fA</sup>	31,08 <sup>cB</sup>	9,38 <sup>eD</sup>	19,66 <sup>fC</sup>
H3	36,08 <sup>ghA</sup>	31,02 <sup>cB</sup>	14,77 <sup>cD</sup>	18,13 <sup>fC</sup>
H4	30,25 <sup>bB</sup>	23,27 <sup>eC</sup>	12,15 <sup>dD</sup>	34,33 <sup>cA</sup>
H5	31,55 <sup>bB</sup>	33,49 <sup>abA</sup>	16,98 <sup>aC</sup>	17,99 <sup>fC</sup>
H6	30,55 <sup>iA</sup>	27,07 <sup>dB</sup>	14,67 <sup>cC</sup>	27,71 <sup>dB</sup>
H7	25,04 <sup>iC</sup>	32,61 <sup>ba</sup>	15,46 <sup>bcD</sup>	26,89 <sup>dB</sup>
H8	21,20 <sup>kC</sup>	34,27 <sup>aA</sup>	15,97 <sup>bD</sup>	28,56 <sup>dB</sup>
H9	71,00 <sup>aA</sup>	16,11 <sup>iB</sup>	2,25 <sup>gD</sup>	10,65 <sup>hC</sup>
H10	57,10 <sup>dA</sup>	20,41 <sup>ghB</sup>	7,48 <sup>fD</sup>	15,01 <sup>gC</sup>
H11	63,44 <sup>cA</sup>	22,77 <sup>efB</sup>	2,32 <sup>gD</sup>	11,47 <sup>hC</sup>
H12	30,37 <sup>bB</sup>	10,43 <sup>jD</sup>	11,98 <sup>dC</sup>	47,23 <sup>aA</sup>
H13	54,57 <sup>eA</sup>	19,29 <sup>hC</sup>	2,29 <sup>gD</sup>	23,85 <sup>eB</sup>
H14	25,73 <sup>bB</sup>	11,15 <sup>jD</sup>	15,29 <sup>bcC</sup>	47,83 <sup>aA</sup>
H15	36,76 <sup>gA</sup>	19,43 <sup>hB</sup>	7,08 <sup>fC</sup>	36,73 <sup>ba</sup>
H16	34,65 <sup>hb</sup>	19,91 <sup>hC</sup>	7,17 <sup>fD</sup>	38,27 <sup>ba</sup>

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

Deste modo, conclui-se que, do ponto de vista nutricional, o melhor perfil peptídico foi obtido para o hidrolisado H14, pois apresentou um dos maiores teores de di- e tripeptídeos (15,29%) e de aminoácidos livres (47,83%), assim como um dos menores teores de grandes peptídeos (25,73%). Entretanto, outros hidrolisados apresentaram perfis peptídicos próximos ao do H14 do ponto de vista nutricional. Este é o caso dos hidrolisados H4, H5, H6 e H7 que apresentaram como desvantagens em relação a H14 e de di- e tripeptídeos (H4), um menor

teor de aminoácidos livres (H4, H5, H6 e H7), assim como um maior conteúdo de grandes peptídeos (H4, H5 e H6). Por outro lado, estes hidrolisados revelaram alguma superioridade em relação ao perfil peptídico do H14, com destaque para H5 que apresentou maior teor de di- e tripeptídeos e de peptídeos médios (F2). Para os outros três hidrolisados (H5, H6 e H7), a única vantagem observada refere-se aos seus teores mais elevados de peptídeos médios.

O perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos do WPC foi, anteriormente, avaliado em dois estudos. No primeiro, diversas enzimas proteolíticas foram empregadas para hidrolisar o WPC, sendo que o melhor perfil peptídico, obtido pela ação de uma protease do *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme, AB Enzymes) (E:S 1:100, 50°C) foi inferior ao do H14 em termos de uma quantidade menor de aminoácidos livres (18,43%). Por outro lado, a quantidade de di- e tripeptídeos foi próxima (16,14%) e o teor de grandes peptídeos (18,76%) foi inferior ao do H14, o que representa uma vantagem do ponto de vista nutricional (SILVA et al., 2010). No segundo estudo, uma subtilisina comercial (Prozyn, São Paulo, SP) foi empregada para hidrolisar o WPC, tendo sido obtido um perfil peptídico inferior ao do H14, com relação ao menor teor de di- e tripeptídeos (13,34%). Por outro lado, a quantidade de aminoácidos livres (45,56%) foi próxima e a de grandes peptídeos foi inferior (12,28%) à do H14, sendo isto considerado uma vantagem do ponto de vista nutricional (AFONSO et al., 2009).

Ressalta-se, ainda, que não foram encontrados na literatura relatos de outros autores que avaliaram o perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos de WPC.

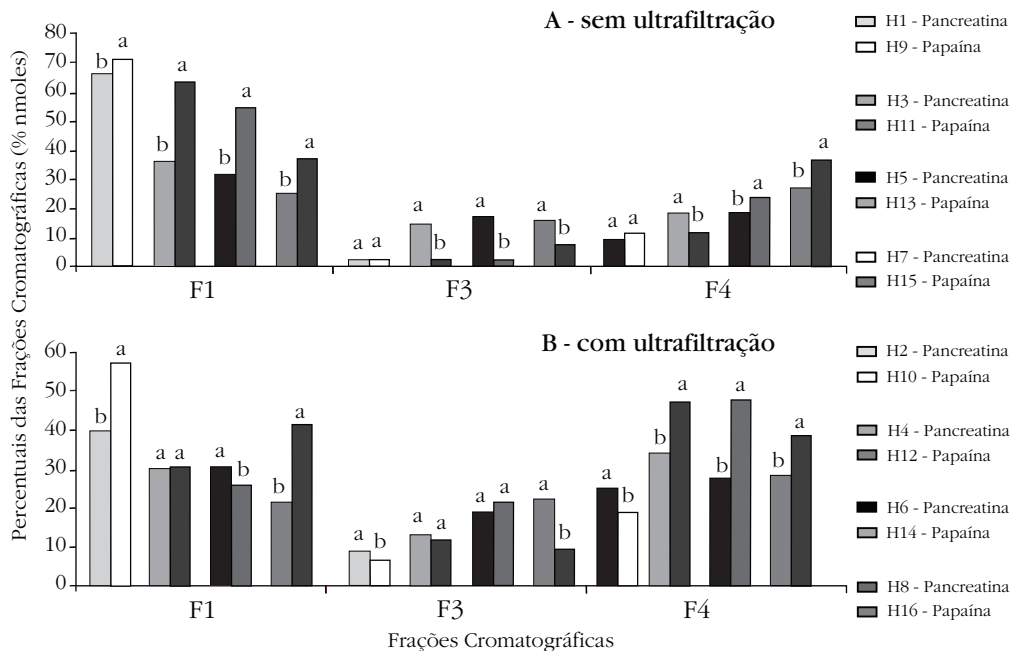
## **EFEITO DE ALGUNS PARÂMETROS SOBRE O PERFIL PEPTÍDICO**

O efeito do tipo de enzima, da relação enzima:substrato (E:S) e do emprego da ultrafiltração (UF), foi avaliado sob dois diferentes aspectos: obtenção do melhor perfil peptídico do ponto de vista nutricional, e redução de custos do processo para adaptação em larga escala (utilização da menor E:S e ausência de UF).

### **Efeito do tipo de enzima**

A figura 2 permite avaliar a influência do tipo de enzima sobre o perfil peptídico dos hidrolisados enzimáticos do WPC. Com o intuito de manter os demais parâmetros constantes, devem ser comparadas as seguintes amostras: H1 com H9, H3 com H11, H5 com H13, H7 com H15, H2 com H10, H4 com H12, H6 com H14 e H8 com H16. Em cada uma das partes A e B da figura 2, estão apresentados quatro destes grupos.

Observa-se na figura 2 que, em termos de número de casos, a utilização da pancreatina foi mais vantajosa do que a papaína, tanto na ausência quanto na presença da UF. Na primeira situação, encontrou-se menor teor de grandes peptídeos em todos os casos, maior quantidade de di- e tripeptídeos em três casos (H11 com H3, H13 com H5 e H15 com H7), e maior conteúdo de aminoácidos livres em um caso (H11 com H3). Enquanto que, sob ação da papaína, também na ausência da UF, a única vantagem foi apresentar maior teor de aminoácidos livres em dois casos (H5 com H13, H7 com H15).



Enzimas utilizadas: pancreatina (H1 a H8), papaína (H9 a H16). F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: peptídeos médios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos (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 do tipo de enzima sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite.**

A vantagem da pancreatina sobre a papaína, na situação em que se empregou a UF, pode ser observada na figura 2, tendo sido obtidos para alguns casos, menores quantidades de grandes peptídeos (H10 com H2, H16 com H8), maiores teores de di- e tripeptídeos (H10 com H2 e H16 com H8) e de aminoácidos livres (H10 com H2). Contudo, a ação da papaína foi mais favorável, em um número inferior de casos, levando a um menor conteúdo de grandes peptídeos (H6 com H14) e quantidade mais elevada de aminoácidos livres (H4 com H12, H6 com H14 e H8 com H16).

Ressalta-se, entretanto, que no cômputo geral a ação da papaína foi mais vantajosa do que a da pancreatina, pois levou à obtenção do melhor perfil peptídico, entre todos os hidrolisados analisados (H14).

Este resultado revela que nem sempre uma enzima de ação mais ampla, como é o caso da pancreatina que possui atividade de endo- e exopeptidase, produz o melhor perfil peptídico. Portanto, a ação mais restrita de uma enzima, como a papaína, que é

uma endopeptidase, dependendo das condições empregadas no preparo de hidrolisados proteicos, pode ser mais vantajosa, levando à obtenção de teores mais elevados de di- e tripeptídeos e de aminoácidos livres.

A influência do tipo de enzima sobre o perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos de soro de leite e de WPC, foi, anteriormente, avaliada em três estudos. Desta maneira, ao se utilizar a mesma pancreatina e uma subtilisina (Prozyn, São Paulo, SP) para hidrolisar soro de leite em pó, observou-se que os três melhores perfis peptídicos foram obtidos, também, pela pancreatina, apresentando, em média, teores de 22,63%, 10,30% e 40,97% para grandes peptídeos, di- e tripeptídeos e aminoácidos livres, respectivamente (SOUZA et al., 2008). No segundo estudo, avaliou-se o efeito das enzimas citadas acima na hidrólise de WPC, e observou-se uma similaridade entre os perfis peptídicos obtidos pela ação destas enzimas. Assim, obtiveram-se teores de di- e tripeptídeos estatisticamente iguais (13,34% para subtilisina e 12,11%, em média, para pancreatina) e valores próximos de aminoácidos livres (45,56% para subtilisina e 49,06%, em média, para a pancreatina) e de grandes peptídeos (12,28% para subtilisina e 12,80%, em média, para a pancreatina), apesar de serem estatisticamente diferentes (AFONSO et al., 2008).

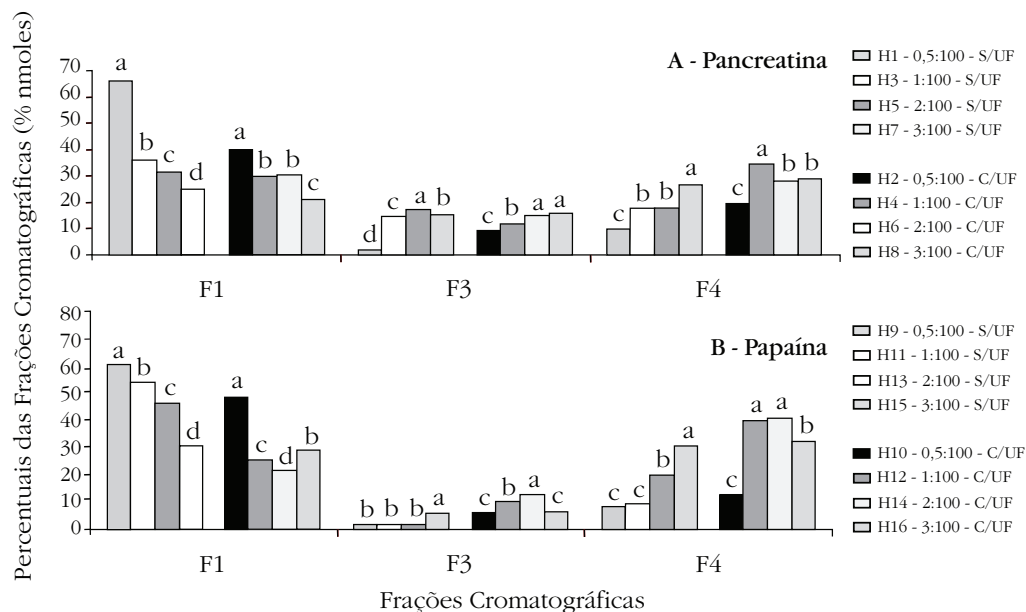
Em outro estudo realizado por Silva et al. (2010), o emprego de diferentes enzimas proteolíticas na hidrólise de WPC, afetou de forma variada o perfil peptídico, sendo que o melhor resultado foi obtido pela ação da protease de *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme, AB Enzymes), apresentando teores de 18,76%, 16,43% e 18,43% para os grandes peptídeos, di- e tripeptídeos e aminoácidos livres, respectivamente.

### **Efeito da relação enzima: substrato**

A influência da relação E:S (0,5:100, 1:100, 2:100 e 3:100) no processo de hidrólise das proteínas do WPC foi avaliada (Figura 3). Com o intuito de manter os demais parâmetros hidrolíticos constantes, a análise dos dados considerou quatro grupos contendo, cada um, quatro hidrolisados: grupo 1 (H1, H3, H5 e H7), grupo 2 (H2, H4, H6 e H8), grupo 3 (H9, H11, H13 e H15) e grupo 4 (H10, H12, H14 e H16). Em cada uma das partes A e B da figura 3, estão apresentados dois destes grupos.

Observa-se na figura 3, a utilização de uma menor relação E:S foi vantajosa no caso da ação da pancreatina para alguns casos. Assim, na ausência da UF, obteve-se maior teor de di- e tripeptídeos, ao se passar de 3:100 para 2:100 (H7 e H5), enquanto que utilizando-se a UF encontrou-se uma quantidade mais elevada de aminoácidos livres, ao se passar de 2:100 para 1:100 (H6 e H4).

Com relação à ação da papaína, observa-se na figura 3 que a utilização de uma menor E:S foi benéfica, apenas quando se empregou a UF, tendo sido encontrados menores teores de grandes peptídeos e maior conteúdo de di- e tripeptídeos e de aminoácidos livres quando se passou de 3:100 para 2:100 (H16 e H14).



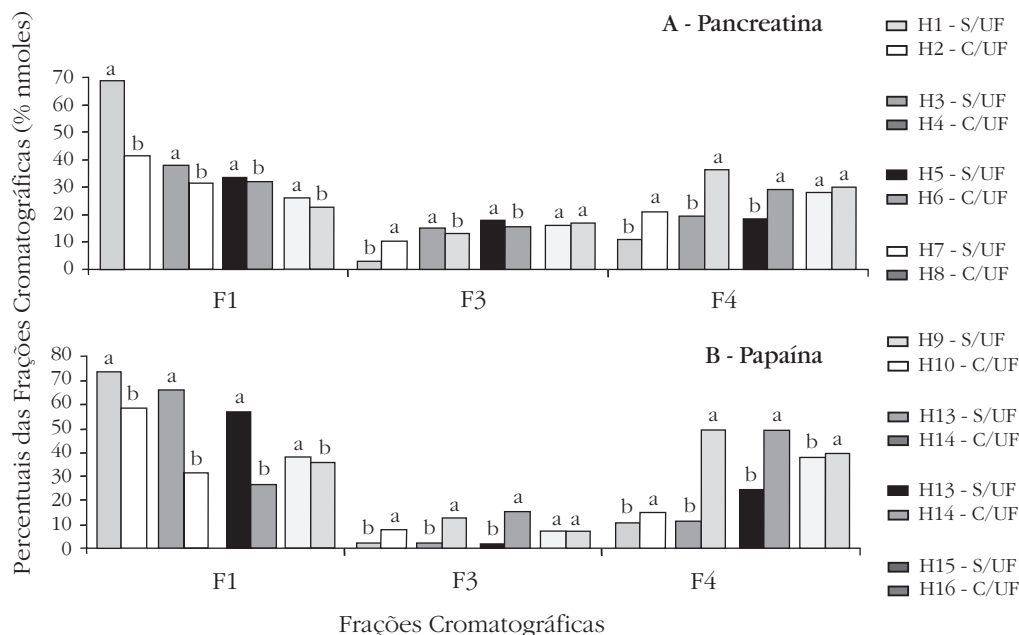
Relações E:S utilizadas: 0,5:100 (H1, H2, H9 e H10), 1:100 (H3, H4, H11, H12), 2:100 (H5, H6, H13, H14) e 3:100 (H7, H8, H15, H16). F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: peptídeos médios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos (2 e 3 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. S/UF: sem ultrafiltração; C/UF: com ultrafiltração. 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.**

O efeito benéfico da utilização de uma menor relação E:S sobre o perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos de WPC já havia sido, anteriormente, demonstrado em dois estudos. Assim, ao se utilizar a mesma pancreatina, foi possível obter menor teor de grandes peptídeos e maior de aminoácidos livres, ao se passar de 4:100 para 2:100 (SILVA et al., 2010). Empregando-se uma subtilisina comercial com E:S de 1:100, 2:100 e 4:100, foi mostrado, em alguns casos, a vantagem da utilização de menor valor ao se passar de 4:100 para 2:100, assim como de 2:100 para 1:100, tendo sido observada uma redução do teor de grandes peptídeos e um aumento da quantidade de aminoácidos livres (AFONSO et al., 2009).

### Efeito da ultrafiltração

Para analisar o efeito da ultrafiltração sobre o perfil peptídico dos hidrolisados proteicos, foram comparadas as seguintes amostras: H1 com H2, H3 com H4, H5 com H6, H7 com H8, H9 com H10, H11 com H12, H13 com H14, H15 com H16, uma vez que os parâmetros tipo de enzima e relação E:S foram mantidos constantes. Em cada uma das partes A e B da figura 4, estão apresentados quatro destes grupos.



Hidrolisados sem ultrafiltração (S/UF): H1, H3, H5, H7, H9, H11, H13 e H15. Hidrolisados com ultrafiltração (C/UF): H2, H4, H6, H8, H10, H12, H14, H16. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: peptídeos médios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos (2 e 3 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. S/UF: sem ultrafiltração; C/UF: com ultrafiltração. 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 da ultrafiltração sobre o perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite.**

Observa-se, na figura 4, que a ausência da ultrafiltração (UF) foi vantajosa para alguns casos, ao se empregar a pancreatina. Deste modo, obteve-se maior teor de di- e tripeptídeos ao se comparar os hidrolisados H4 com H3 e o H6 com H5. Não foi observado o efeito benéfico da ausência da UF em termos de grandes peptídeos e de aminoácidos livres. Em relação à ação da papaína, não foi observada a vantagem da ausência da UF sobre o perfil peptídico dos hidrolisados enzimáticos de WPC.

Este parâmetro foi, igualmente, avaliado, anteriormente por Delvivo et al. (2005) em hidrolisados de soro de leite em pó, utilizando uma pancreatina comercial (Sigma, St. Louis, MO, EUA), sendo que, ao contrário da pancreatina utilizada, o efeito benéfico da ausência da UF não foi observado, pois o emprego da UF promoveu maior quantidade das frações peptídicas mais desejadas (di- e tripeptídeos, aminoácidos livres), além de reduzir os teores de grandes peptídeos.

Deve-se considerar que na fabricação de hidrolisados proteicos, em larga escala, o emprego da UF elevaria o custo da produção por constituir uma etapa suplementar no processo. Por outro lado, as vantagens imunológicas e nutricionais das frações proteicas

obtidas pelo emprego da UF não podem ser negligenciadas, já que pode diminuir o poder alergênico destes preparados enzimáticos (CHANDRA, 2002; EXL, 2001; VAN BERESTEIJN et al., 1994), além de enriquecê-los em oligopeptídeos (VAN BERESTJEIN et al., 1994), visto que a membrana empregada restringe a passagem de moléculas maiores que 10.000Da.

## CONCLUSÃO

O emprego da pancreatina e da papaína foi eficiente na obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico do soro de leite com perfil peptídico nutricionalmente adequado. O efeito dos parâmetros tipo de enzima, relação enzima:substrato e o emprego da ultrafiltração foi variado, sendo que o melhor perfil peptídico foi obtido empregando-se a papaína em uma E:S de 2:100, após a ultrafiltração, tendo sido obtidos 15,29% de di- e tripeptídeos, 47,83% de aminoácidos livres e 25,73% de grandes peptídeos.

## REFERÊNCIAS/REFERENCES

- AFONSO, W. O.; BIASUTTI, E. A. R.; CASTRO, V. M.; SILVA, V. D. M.; SILVESTRE, M. P. C. Utilização do soro de leite visando reduzir a poluição ambiental: hidrólise pela pancreatina. *Tecno-log.*, v. 12, n. 2, p. 7-16, 2008.
- 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. Alimen.*, v. 34, n. 1, p. 97-114, 2009.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 16. ed., 3. rev. Arlington: AOAC International, 1995. 1141 p.
- 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, Nov 2004.
- 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. *Rev. Cienc. Agrotec.*, v. 30, n. 2, p. 308-316, mar.-apr. 2006.
- BRANS, G.; SCHROËN, 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, Nov 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.
- CHANDRA, R. K. Breast feeding, hydrolysates formulas and delayed introduction of selected foods in the prevention of food hypersensitivity and allergic disease. *Nutr. Res.*, v. 22, n. 1-2, p. 125-135, 2002.
- CHICÓN, R.; BELLOQUE, J.; ALONSO, E.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. *Food Hydrocoll.*, v. 23, n. 3, p. 593-599, May 2009.
- DANIEL, H.; RUBIO-ALIAGA, I. An update on renal peptide transporters. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, v. 284, n. 5, p. 885-892, May 2003.



DELVIVO, F. M.; SILVA, V. D. M.; MORAIS, H. A.; FIGUEIREDO, A. F. S.; AGUIAR, M. J. B.; COELHO, J. V.; SILVESTRE, M. P. C. Desenvolvimento de formulação dietética para fenilcetonúricos à base de hidrolisados de soro de leite. *Rev. Bras. Nutr. Clin.*, v. 20, n. 3, p. 117-126, 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.

EXL, B. M. A review of recent developments in the use of moderately hydrolyzed whey formulae in infant nutrition. *Nutr. Res.*, v. 21, n.1, p. 355-379, Jan 2001.

EMBRAPA. 2010. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_128\\_21720039243.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html)>. Acesso em: 10 nov. 2010.

FRENHANI, P. B.; BURINI, R. B. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. *Arg. Gastroenterol.*, v. 36, n. 4, p. 227-235, out.-dez. 1999.

GILBERT, E. R.; WONG, E. A.; WEBB Jr, K. E. Board - invited review: Peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health. *J. Anim. Sci.*, v. 86, n. 9, p. 2135-2155, Sept 2008.

GOLOVCHENKO, N.; KATAEVA, I. A.; AKIMENKO, V. K. Analysis of pH-dependent protein interactions with gel filtration medium. *J. Chromatogr. A*, v. 591, n. 1-2, p. 121-128, Feb 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, Aug 1994.

HINSBERGER, A.; SANDHU, B. K. Digestion and absorption. *Curr. Paediatr.*, v. 14, p. 605-611, 2004.

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, n. 1-2, p. 178-183, Oct 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, May 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. Process.*, v. 86, n. 1, p. 1-6, Mar 2008.

LOPES, D. C. F.; BIZZOTTO, C. S.; SILVA, V. D. M.; AFONSO, W. O.; LOPES Jr., C. O.; SILVESTRE, M. P. C. Obtention of low-phenylalanine protein hydrolysates from rice: use of two pancreatins. *J. Food Technol.*, v. 6, n. 2, p. 57-65, 2008.

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.

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, Mar 2005.

MORATO, A. F.; CARREIRA, R. L.; JUNQUEIRA, R. G.; SILVESTRE, M. P. C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contentes of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J. Food Comp. Anal.*, v. 13, n. 5, p. 843-857, Oct 2000.

- 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, Sept 2005.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 14. ed. Piracicaba: Nobel, 2000. 477 p.
- ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 44, n. 4, p. 563-575, out.-dez. 2008.
- SAINT-SAUVEUR, D.; GAUTHIER, S. F.; BOUTIN, Y.; MONTONI, A. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. *Intern. D. J.*, v. 18, n. 3, p. 260-270, Mar 2008.
- SILVA, M. C.; SILVA, V. D. M.; LANA, A. M. Q.; SILVESTRE, M. P. C. Grau de hidrólise e perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos obtidos a partir de concentrado proteico do soro do leite. *Aliment. Nutr.*, v. 20, n. 3, p. 395-402, jul.-set. 2009.
- 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 lowphenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *Am. J. Food Technol.*, v. 2, n. 5, p. 327-341, 2007.
- SILVESTRE, M. P. C.; HAMON, M.; YVON, M. Analysis 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, Dec 1994a.
- SILVESTRE, M. P. C.; HAMON, M.; YVON, M. Analysis 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, Dec 1994b.
- 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.
- SOARES, R. D. L.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E. A. R.; SILVESTRE, M. P. C. Enzyme catalyzed production of oligopeptides from skim milk. *Food Biotechnol.*, v. 21, p. 45-56, Jan 2007.
- SOUZA, M. W. S.; BIASUTTI, E. A. R.; CARREIRA, R. L.; AFONSO, W. O.; SILVA, V. D. M.; SILVESTRE, M. P. C. Obtaining oligopeptides from whey: use of subtilisin and pancreatin. *Am. J. Food Technol.*, v. 3, n. 5, p. 315-324, 2008.
- VAN BERESTEIJN, E. C. H.; PEETERS, R. A.; KAPER, J.; MEIJER, R. J. G. M.; ROBBEN, A. J. P. M.; SCHMIDT, D. G. Molecular mass distribution, immunological properties and nutritive value of whey protein hydrolysates. *J. Food Prot.*, v. 57, n. 7, p. 619-625, Jul 1994.
- 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. A*, v. 599, n.1-2, p. 205-209, May 1992.

Recebido para publicação em 07/06/10.

Aprovado em 07/11/10.