

# Hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado como fonte de oligopeptídeos para formulações dietéticas

## *Enzymatic hydrolysates from skimmed powder milk as source of oligopeptides for dietary formulations*

### ABSTRACT

LOPES, D.C.F.; SILVA, V.D.M.; MORAIS, H.A.; SANTORO, M.M.; FIGUEIREDO, A.F.S.; SILVESTRE, M.P.C. Enzymatic hydrolysates from skimmed powder milk as source of oligopeptides for dietary formulations. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, São Paulo, SP. v.24, p.51-70, dez., 2002.

*Six enzymatic hydrolysates from skimmed powder milk were prepared with the aim of producing dietary formulations for phenylketonurics. A protease from *Aspergillus oryzae* (AO) alone or in association with papain (PA) was used in different reaction times and enzyme:substrate ratios (E:S, 1 to 20%). The interest of this work is associated with the study of the peptide distribution in these samples, according to the chain size, in order to evaluate their nutritional quality. Initially, the hydrolysates were fractionated by size-exclusion HPLC and the rapid method of Correct Fraction Area (CFA) was used for quantifying peptides and free amino acids in the chromatographic fractions. The results showed that the skim powder milk hydrolysate obtained by the association of AO with PA in ratio of 1% and 2%, respectively, in relation to the skim powder milk, 5 h incubation at 50 °C, produced the best peptide profile, with larger proportion of di- and tripeptides and lower of free amino acids.*

**Keywords:** dietary formulation, peptide profile, enzymatic hydrolysis, phenylketonuria, skimmed powder milk, papain, protease from *Aspergillus oryzae*

DANIELLA CRISTINE FIALHO LOPES <sup>1</sup>, VIVIANE DIAS MEDEIROS SILVA <sup>2</sup>, HARRIMAN ALEY MORAIS <sup>2</sup>, MARCELO MATOS SANTORO <sup>3</sup>, AMINTAS FABIANO DE SOUZA FIGUEIREDO <sup>4</sup>, MARIALICE PINTO COELHO SILVESTRE <sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Alimentos, FF/UFMG.

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG.

<sup>4</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FF/UFMG.

<sup>1</sup>Trabalho baseado na dissertação de mestrado Perfil peptídico e remoção de fenilalanina de hidrolisados de leite em pó desnatado: tratamento em solução com carvão ativado. Realizado no Departamento de Alimentos, FF/UFMG, 2000.

**Endereço para correspondência:**  
Av. Olegário Maciel, 2360, Bairro Lourdes, CEP: 30180-112, Belo Horizonte, MG. E-mail: malice@farmacia.ufmg.br

**Agradecimentos:**  
Ao apoio financeiro das agências CAPES, CNPq e FAPEMIG nas formas de Auxílio à Pesquisa e bolsas de Mestrado, Aperfeiçoamento e Iniciação Científica.

## RESUMEN

Seis hidrolisados de leche en polvo desnatado fueron preparados con el objetivo de producir formulaciones dietéticas. Para eso, fue utilizada una protease de *A.oryzae* (AO), aislada o en asociación con la papaína (PA), en diferentes tiempos de reacción y relación enzima:substrato (E:S). El interés de ese trabajo está asociado al estudio de la distribución de los péptidos, en esas muestras, de acuerdo con el tamaño de las cadenas, como criterio de evaluación de la calidad nutricional. Inicialmente, los hidrolisados fueron fraccionados por cromatografía líquida de alta eficiencia de exclusión molecular (SE-HPLC) y para la cuantificación de los componentes de las fracciones cromatográficas, fue utilizado el método rápido de la Área Corregida de la Fracción (ACF). Los resultados indican que el hidrolisado de leche en polvo desnatado obtenido con la asociación de las enzimas AO y PA, en las proporciones de 1% y 2%, respectivamente, en relación a la cantidad de leche en polvo desnatado, con 5h de incubación a 50 °C, produjo el mejor perfil peptídico, o sea, mayor proporción de di- y tripeptídeos y menor proporción de aminoácidos libres.

**Palabras clave:** formulacione dietética, perfil peptídico, fenilcetonúria, hidrólise enzimática, leche en polvo desnatado, papaína, protease de *Aspergillus oryzae*

## RESUMO

Seis hidrolisados de leite em pó desnatado foram preparados visando a produção de hidrolisados protéicos para uso em formulações dietéticas para fenilcetonúricos. Para isso utilizaram-se uma protease do *Aspergillus oryzae* (AO), isoladamente ou em associação com a papaína (PA), em diferentes tempos de reação e relação enzima:substrato (E:S). O interesse deste trabalho está associado ao estudo da distribuição dos peptídios nestas amostras, de acordo com o tamanho da cadeia, como critério de avaliação de sua qualidade nutricional. Inicialmente, os hidrolisados foram fracionados por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) e, para a quantificação dos componentes das frações cromatográficas, empregou-se o método rápido da Área Corregida da Fração (ACF). Os resultados indicam que o hidrolisado de leite em pó desnatado obtido com a associação das enzimas AO com a PA nas proporções de 1% e 2%, respectivamente, em relação à quantidade de leite em pó desnatado, com 5 h de incubação a 50 °C, produziu o melhor perfil peptídico, a saber, maior proporção de di- e tripeptídeos e menor proporção de aminoácidos livres.

**Palavras-chave:** formulação dietética, perfil peptídico, hidrólise enzimática, fenilcetonúria, leite em pó desnatado, papaína, protease do *Aspergillus oryzae*

## INTRODUÇÃO

Desde 1940, os hidrolisados protéicos vêm sendo utilizados com finalidades terapêuticas para a manutenção do estado nutricional de pacientes com restrições de proteínas ou aminoácidos em sua dieta. O emprego destas preparações enzimáticas apresentou expressivo crescimento ao longo dos últimos anos, tanto por seus aspectos nutricionais e clínicos, como pela melhoria das propriedades funcionais das proteínas (CÂNDIDO, 1998; LEÓNIL *et al.*, 2000). Assim, os hidrolisados de proteínas têm sido usados na fabricação de alimentos especiais para recém-nascidos prematuros, em fórmulas para crianças que apresentam diarreia, gastroenterite, má-absorção e fenilcetonúria (SMITHERS e BRADFORD, 1991; CLEMENTE, 2000). Além disso, são empregados na suplementação de dietas para idosos, na nutrição de esportistas e em dietas para controle de peso (FRØKJAER, 1994).

O valor nutricional dos hidrolisados está diretamente relacionado à natureza da proteína de origem, que deverá ser de alto valor nutricional, e ao método de hidrólise que possibilite a obtenção de misturas de peptídios com pesos moleculares diferentes (GRIMBLE *et al.*, 1986; SILVESTRE *et al.*, 1994a,b).

Vários trabalhos têm comparado a absorção de aminoácidos originados da hidrólise enzimática de proteínas com uma mistura equivalente de aminoácidos livres. A velocidade de absorção intestinal de aminoácidos é consideravelmente maior nas soluções contendo di- e tripeptídeos ou proteína parcialmente hidrolisada, do que nas soluções contendo apenas aminoácidos livres (ADIBI e MORSE, 1971; ADIBI e SOLEIMANPOUR, 1974; KEOHANE *et al.*, 1985; BOZA *et al.*, 1995; SYNOWIECKI *et al.*, 1996). O estudo do mecanismo de absorção intestinal de aminoácidos e de pequenos peptídios revela que a taxa de absorção de aminoácidos livres é menor do que aquela dos pequenos peptídios, sugerindo que na absorção de di- e tripeptídeos a competição entre aminoácidos, que compartilham o mesmo sistema de transporte, seja parcial ou completamente eliminada (GRIMBLE *et al.*, 1986; CLEMENTE, 2000).

Alguns autores têm usado diferentes enzimas, em diferentes condições hidrolíticas na obtenção de hidrolisados protéicos especiais para a nutrição de fenilcetonúricos (KITAGAWA *et al.*, 1987; LOPEZ-BAJONERO *et al.*, 1991; MOSZCZYNSKI e IDZIAK, 1993; KASAI *et al.*, 1994; OUTINEN *et al.*, 1996; TESMER *et al.*, 1998; ETZEL e MADISON, 1999). Entretanto, em nenhum destes trabalhos foi realizada uma avaliação dos hidrolisados em função do seu perfil peptídico para quantificar os oligopeptídeos dos hidrolisados. Esta etapa seria importante visto que a qualidade nutricional e a imunogenicidade de um hidrolisado está diretamente relacionado ao teor de grandes, médios, di- e tripeptídeos além dos aminoácidos livres (GRIMBLE *et al.*, 1986; SILVESTRE *et al.*, 1994a,b).

Nosso interesse pelos hidrolisados protéicos, relaciona-se ao preparo de formulações dietéticas para fenilcetonúricos. Este trabalho representa o primeiro passo nesta direção e consiste em caracterizar o perfil peptídico de hidrolisados protéicos. Assim, uma protease do *Aspergillus oryzae* foi utilizada, isoladamente ou em associação com a papaína, em diferentes condições de reação, para hidrolisar o leite em pó desnatado e

produzir hidrolisados protéicos com perfil peptídico adequado para fins dietéticos, ou seja, maior proporção de di- e tripeptídeos e menor de aminoácidos livres. Os hidrolisados foram fracionados por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) e os peptídios e os aminoácidos livres quantificados pelo método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF) desenvolvido por SILVESTRE et al. (1994 a, b).

## MATERIAL E MÉTODOS

### MATERIAL

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usado no fracionamento dos hidrolisados protéicos consistiu de uma coluna cromatográfica PHEA [poli-(2-hidroxietilaspártamida)-sílica], 250 X 9,4 mm, 5 $\mu$ m e 200 Å (PolyLC, Columbia, MD, EUA), uma bomba isocrática e um detector espectrofotométrico em UV-VIS (série HP1100, Waldbronn, Alemanha), acoplado a um computador com software HPchemstation (Avondale, EUA). As amostras foram liofilizadas no liofilizador Free Zone, modelo 77500, Labconco (Kansas City, MI, EUA). A pancreatina, a tripsina, a protease tipo XXIII do *Aspergillus oryzae* (P-4032), o fenol cristalino, o ácido clorídrico e trietanolamina (grau HPLC) foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EUA). A papaína foi gentilmente doada pela BIOBRÁS (Montes Claros, MG, Brasil). O leite em pó desnatado da marca Glória (Itaperuna, RJ, Brasil), sem adição de vitaminas ou sais minerais, foi comprado em um supermercado de Belo Horizonte. A água, para uso no cromatógrafo, foi purificada pelo Sistema de Purificação de Água Aries (Vaponics, EUA). As membranas de celulose, para filtração das amostras (0,20  $\mu$ m) e dos solventes (0,45  $\mu$ m), foram adquiridas da Sartorius (Alemanha).

As frações foram coletadas no sistema Spectra/Chrom<sup>®</sup>, CF1 Fraction Collector (Houston, EUA). A análise de aminoácidos foi realizada em coluna de cromatografia de fase reversa (C18) Pico Tag<sup>®</sup> – Waters (Massachusetts, EUA), HPLC com detector espectrofotométrico de comprimento de onda variável e computador Cromatopac – CR4A Shimadzu (Kyoto, Japão). A hidrólise ácida foi realizada em tubos de borossilicato Pyrex (Corning, New York, EUA).

O fenilisotiocianato e a solução padrão de aminoácidos foram adquiridos da Pierce (Rockford, EUA). O ácido fórmico, o álcool etílico (grau HPLC), o álcool metílico (grau HPLC) e o acetato de sódio foram adquiridos da Merck (Whitehouse Station, NJ, EUA); a acetonitrila (grau HPLC) foi adquirida da Baker Analysis (Phillipsburg, NJ, EUA) e o nitrogênio foi adquirido da White Martins (São Paulo, Brasil).

## MÉTODOS

### PREPARO DA CURVA PADRÃO

Para quantificar os peptídios e os aminoácidos livres nos hidrolisados protéicos de leite em pó desnatado, foi desenhada uma curva padrão constituída da Área Corrigida da Fração (ACF) versus o conteúdo de aminoácidos das frações separadas por SE-HPLC dos hidrolisados-padrão como descrito por SILVESTRE *et al.* (1994b) e MORATO *et al.* (2000).

### PREPARO DOS HIDROLISADOS-PADRÃO DE LEITE EM PÓ DESNATADO

Cinco hidrolisados-padrão foram preparados, de acordo com o método descrito por SILVESTRE *et al.* (1994a). As soluções de leite em pó desnatado preparadas em tampão fosfato 0,01mol/L (pH 7,5), contendo em 1% (p/v) de proteína, foram, inicialmente, pré-aquecidas em banho-maria a 80 °C por 10 min. A seguir, a temperatura foi ajustada para 37 °C, e as enzimas, pancreatina ou tripsina foram adicionadas em quantidades (p/p) para se obter a relação enzima:substrato (E:S) desejada (Tabela 1). As incubações foram realizadas em diferentes intervalos de tempo (Tabela 1) e as hidrólises foram interrompidas abaixando o pH para 2,5 com a adição de ácido fórmico p.a. Os hidrolisados-padrão assim preparados foram, então, liofilizados. As outras condições das reações estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1** Condições hidrolíticas empregadas na preparação dos hidrolisados-padrão de leite em pó desnatado

Hidrolisados	E:S	(%)	Tempo de hidrólise
	P	T	(h)
P1	4	—	06
P2	0,5	—	02
P3	0,5	—	06
T1	—	0,5	15
T2	—	4	02

Relação E:S = Relação enzima:substrato; P= pancreatina; T= tripsina

### FRACIONAMENTO DOS HIDROLISADOS-PADRÃO

O fracionamento dos hidrolisados-padrão foi realizado por SE-HPLC em coluna PHEA, como descrito por SILVESTRE *et al.* (1994b). As amostras liofilizadas foram dissolvidas em quantidades suficientes para preparar soluções a 0,4% (p/v), em solução de ácido fórmico 0,05 mol/L (pH 2,5) e cromatografadas à temperatura ambiente, sob condições isocráticas, a um fluxo de 0,5 mL/min durante 35 min. A fase móvel foi filtrada,

em membrana de 0,45 µm, e sonicada imediatamente antes do uso. A detecção dos picos cromatográficos foi realizada em três comprimentos de onda: 230, 280 e 300 nm, cada hidrolisado foi cromatografado dez vezes e quatro frações (F1-F4) foram coletadas após cada cromatografia, sendo F1 de 14,4 a 18,9 min; F2 de 18,9 a 22,4 min; F3 de 22,4 a 23,4 min e F4 de 23,4 a 33 min. O solvente foi removido, de cada fração, em evaporador Centrivap (Labconco, EUA).

## **ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS**

Uma alíquota de cada fração dos hidrolisados coletada na cromatografia em SE-HPLC, foi evaporada, e hidrolisada em HCL 5,7 mol/L a 110 °C por 24 h. Após a hidrólise, os solventes e componentes voláteis foram removidos por centrifugação na centrífuga Speed Vac (Unequip, EUA), a 50 °C por 15 min. Para neutralizar qualquer ácido residual que tenha ficado no tubo, acrescentou-se a cada tubo 20 µL da solução de ressecagem (metanol:água:trietilamina – 2:2:1) os tubos foram agitados em Vortex (Ika, EUA) e, em seguida, o material foi novamente seco na Speed Vac a 50 °C por 15 min. Para a derivatização das amostras, foi preparada uma solução misturando-se etanol, água, trietilamina e fenilisotiocianato (PITC) na proporção de 7:2:1:1, respectivamente. A cada tubo contendo o material evaporado, foram adicionados 20 µL desta solução e, após homogeneização, os tubos foram deixados a 25 °C por 20 min. O excesso de reagente foi removido por centrifugação na centrífuga Speed Vac a 25 °C durante uma hora. Cada amostra derivatizada seca foi dissolvida em 150 µL de tampão acetato de sódio 0,14 mol/L (pH 7,5), contendo 5% (v/v) de acetonitrila. A seguir, 20 µL de cada amostra foi cromatografada em fase reversa a 40 °C com um fluxo de 1 mL/min. As concentrações de triptofano foram determinadas apenas nas frações não hidrolisadas.

## **CÁLCULO DA ÁREA CORRIGIDA DA FRAÇÃO (ACF)**

A ACF foi determinada pelo método desenvolvido por SILVESTRE *et al.* (1994b), baseado na multidetecção das frações em três comprimentos de onda (230, 280 e 300 nm). Considerando que a absorção a 230 nm da tirosina e do triptofano é superior a dos outros aminoácidos, é necessário se fazer uma correção da área das frações (ACF), eliminando-se a interferência destes dois aminoácidos. Para tal, faz-se a corrida dos cromatogramas nestes três comprimentos de onda e, posteriormente, através de cálculo, chega-se à ACF. Finalmente, a ACF foi relacionada ao teor de aminoácidos das frações obtendo-se, assim, a curva padrão.

## **PREPARAÇÃO DOS HIDROLISADOS TESTES DE LEITE EM PÓ DESNATADO**

As soluções de leite em pó desnatado preparadas a 0,35% (p/v) (conteúdo correspondendo à concentração protéica de 0,25%) em tampão fosfato 0,01 mol/L (pH 6,0), foram, inicialmente, aquecidas a 80 °C por 10 min. A seguir, a temperatura foi reduzida

a 50 °C, por meio do banho de gelo, e as enzimas, uma protease do *Aspergillus oryzae* (AO) isoladamente ou em associação com a papaína (PA), foram adicionadas em quantidades suficientes para se obter as relações E:S desejadas (Tabela 2). As hidrólises foram, então, interrompidas pela redução da temperatura para 10°C (banho de gelo). Em seguida, os hidrolisados foram liofilizados. As outras condições das reações estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2 Condições hidrolíticas empregadas no preparo dos hidrolisados testes de leite em pó desnatado**

Hidrolisados	Tempo de hidrólise (h)	E:S (%)	
		AO	PA
H1	AO (1h) + PA (4h)	1	2
H2	AO (2h) + PA (8h)	1	2
H3	AO (5h) + PA (20h)	1	2
H4	AO (15h) + PA (10h)	1	2
H5	AO (5h)	1	—
H6	AO (1h) + PA (4h)	10	20

E:S = Relação enzima:substrato; AO= protease do *Aspergillus oryzae*; PA= papaína

A escolha das condições de reação para a preparação dos hidrolisados testes, baseou-se no seguinte critério: o hidrolisado H3 tomado como referência, reproduzindo as condições hidrolíticas usadas por LOPEZ-BAJONERO *et al.* (1991) que possibilitaram, ao autor, a maior remoção de Phe. Nos demais hidrolisados as condições foram modificadas, reduzindo-se o tempo de ação das enzimas (hidrolisados H1, H2 e H4), elevando-se a relação E:S (hidrolisado H6) ou empregando-se apenas uma das enzimas (hidrolisado H5).

#### **FRACIONAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE PEPTÍDIOS E AMINOÁCIDOS LIVRES DOS HIDROLISADOS TESTES DE LEITE EM PÓ DESNATADO**

Os hidrolisados testes foram fracionados pelo mesmo procedimento descrito para os hidrolisados-padrão. A quantificação dos peptídios e dos aminoácidos livres presentes nos hidrolisados testes foi realizada pelo método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF) segundo SILVESTRE *et al.* (1994b). A partir dos valores da ACF, as quantidades dos peptídios e dos aminoácidos livres foram determinados por interpolação gráfica na curva padrão.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

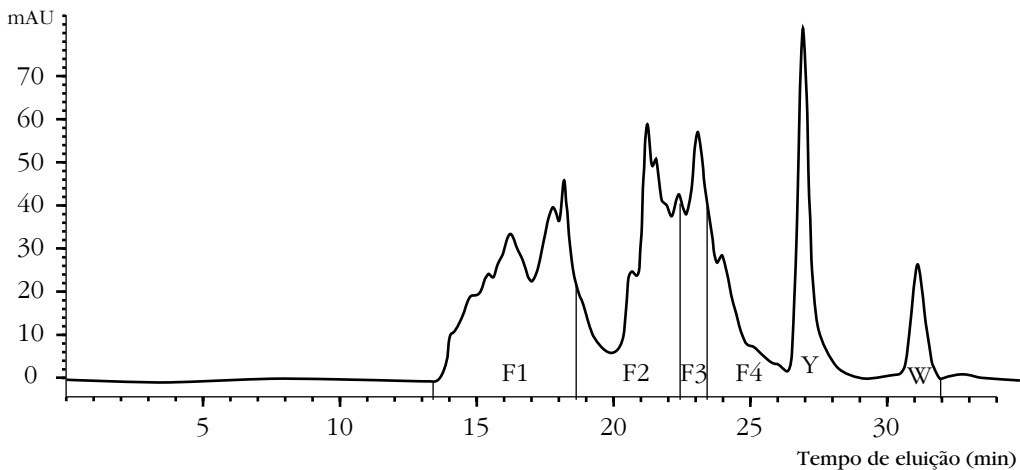
Todas as determinações analíticas foram realizadas em triplicata. Para as determinações das diferenças entre as médias e dos conteúdos de aminoácidos das frações cromatográficas dos hidrolisados de leite em pó desnatado foram realizadas a Análise Fatorial e o Teste de Duncan. Na determinação da diferença entre as médias das áreas dos picos da Phe nos hidrolisados de leite em pó desnatado foram realizadas a Análise de Variância (ANOVA fator único) e o teste de Duncan. A regressão linear foi usada para a curva padrão. (GOMES, 1990).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS-PADRÃO

#### FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - EXCLUSÃO MOLECULAR (SE-HPLC)

A título de exemplo, o perfil cromatográfico do hidrolisado padrão P1 está apresentado na Figura 1. Os hidrolisados-padrão foram separados em quatro frações (F1 - F4) por SE-HPLC (Figura 1). A fração 1 corresponde aos peptídios contendo mais que 7 resíduos de aminoácidos; a fração 2, de 4 a 7 resíduos de aminoácidos; a fração 3, di- e tripeptídeos e a fração 4 contendo os aminoácidos livres, como descrito anteriormente (SILVESTRE *et al.*, 1994b, MORATO *et al.*, 2000; CARREIRA *et al.*, 2001; MORAIS *et al.*, 2002).

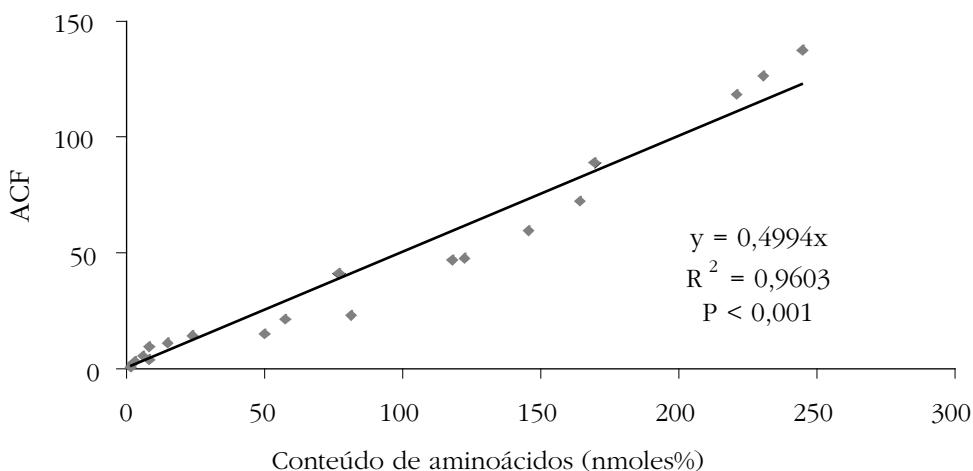


**Figura 1** Perfil cromatográfico do hidrolisado padrão P1. Condições: Coluna PHEA (250 x 9,4 mm, 5  $\mu$ m e 200  $\text{\AA}$  - PolylC), 6h de hidrólise com pancreatina em tampão fosfato de sódio, pH 7,5, E:S = 4% a 37  $^{\circ}$ C. Detecção das frações em 230 nm. F1: grandes peptídios (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Y = pico da tirosina, W = pico do triptofano.



## CURVA PADRÃO

A curva padrão do método da Área Corrigida da Fração (ACF), apresentada na Figura 2, é composta pelos valores de ACF versus as quantidades de aminoácidos livres resultantes das hidrólises ácidas das frações cromatográficas provenientes dos hidrolisados enzimáticos do leite em pó desnatado. Foram usados os valores de ACF das quatro frações cromatográficas isoladas da coluna SE-HPLC. Foi obtida uma correlação de 0,9583 ( $P < 0,001$ ), muito próxima das correlações de 0,9858 ( $P < 0,001$ ) e 0,9845 ( $P < 0,001$ ) obtidas por SILVESTRE *et al.* (1994b) e MORATO *et al.* (2000), respectivamente, para as curvas padrões resultantes de trabalhos com a caseína.

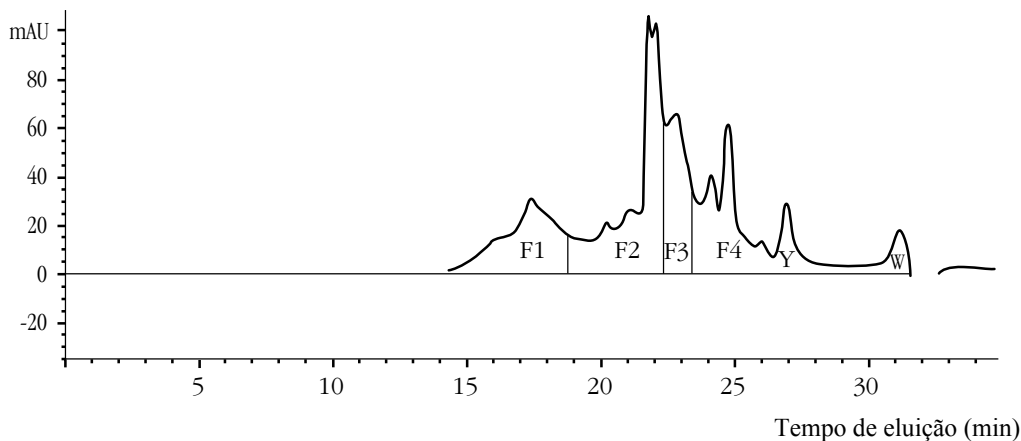


**Figura 2** Curva padrão para a quantificação dos teores de peptídios e aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados de leite em pó desnatado. ACF = Área Corrigida da Fração.

## CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS TESTES DE LEITE EM PÓ DESNATADO

### FRACIONAMENTO EM SE-HPLC

O perfil cromatográfico do hidrolisado H1, a 230 nm, está apresentado na Figura 3. Como pode-se observar, foram separadas quatro frações cromatográficas (F1 – F4). Os últimos dois picos (Y e W) na fração 4, correspondem à tirosina e ao triptofano, respectivamente.



**Figura 3** Perfil cromatográfico do hidrolisado teste H1. Condições: Coluna PHEA (250 x 9,4 mm, 5  $\mu$ m e 200 Å – PolylC), 1h de hidrólise com a protease do *Aspergillus oryzae* (relação E:S = 1%) mais 4h de hidrólise com a papaína (relação E:S = 2%) em tampão fosfato de sódio, pH 6,0, a 50 °C. Detecção das frações em 230 nm. F1: grandes peptídios (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Y = pico da tirosina, W = pico do triptofano.

Diferentes técnicas têm sido utilizadas no fracionamento de peptídios em hidrolisados protéicos. A maioria refere-se ao fracionamento de peptídios com massa molecular superior a 1000 Da. Dentre estas técnicas destacam-se a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), a cromatografia de exclusão molecular (SEC), a HPLC capilar e de troca de ligante (LEMIEUX e AMIOT, 1990; ADACHI *et al.*, 1991; ARMSTEAD e LING, 1991; AUBRY *et al.*, 1992; DAVIS e LEE, 1992; VISSER *et al.*, 1992; ZHANG *et al.*, 1992; GALLAGHER *et al.*, 1993; PARRADO *et al.*, 1993; PEREA *et al.*, 1993).

Estas técnicas têm demonstrado uma série de inconvenientes, tais como, interações secundárias (eletrostáticas ou hidrofóbicas) entre os solutos e a fase estacionária e a ineficiência para separar pequenos peptídios (VERNEUIL *et al.*, 1990; LEMIEUX *et al.*, 1991; GOLOVCHENKO *et al.*, 1992). Outros autores como LEMIEUX e AMIOT (1990) e DAVIS e LEE (1992), respectivamente, relataram a dificuldade de separar os peptídios de acordo com o tamanho da cadeia, tendo observado uma superposição de pesos moleculares empregando a SE-HPLC ou a HPLC capilar.

Entretanto, a técnica de SE-HPLC utilizada no presente trabalho, mostrou ser eficiente na caracterização de hidrolisados protéicos, especialmente quando o interesse está voltado para o fracionamento de peptídios de baixas massas moleculares, ou seja, inferiores a 1000 Da (SILVESTRE *et al.*, 1994a, LÉONIL *et al.*, 2000; MORATO *et al.*, 2000, CARREIRA *et al.*, 2001a, b; MORAIS *et al.*, 2002).

## QUANTIFICAÇÃO DE PEPTÍDIOS E AMINOÁCIDOS LIVRES DOS HIDROLISADOS TESTES

O teor de peptídios e aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados testes está apresentado na Tabela 3. Observa-se uma semelhança, do ponto de vista nutricional, no perfil peptídico dos hidrolisados de H1 a H5, com ligeira superioridade para H1, que apresentou o menor teor de aminoácidos livres. Neste sentido, fica, também, evidenciada a vantagem, embora pequena, do emprego da protease do *Aspergillus oryzae* (AO) em associação com a papaína (PA) (hidrolisado H1) sobre a sua ação isolada (hidrolisado H5).

Considerando-se os diversos fatores citados por GONZALEZ-TELLO (1994), que devem ser avaliados em um hidrolisado protéico para uso em dietas especiais, pode-se concluir que, os melhores resultados foram obtidos para os hidrolisados H1, H2, H3, H4 e H5, uma vez que apresentaram maiores teores de di- e tripeptídeos (média de 14%) e peptídios com massa molecular média de 500 Da (média de 38%) e, além disso, baixa porcentagem de aminoácidos livres (média de 27%).

Ressalta-se, ainda, na Tabela 3, que o hidrolisado H6 apresentou o menor teor de grandes peptídios mas, por outro lado, possui uma quantidade de aminoácidos livres bem mais elevada que os demais hidrolisados. Além disso, o H6 foi o mais pobre em médios e di- e tripeptídeos. Por tudo isto, este hidrolisado pode ser considerado o que apresenta o perfil peptídico mais desvantajoso, do ponto de vista nutricional, como também no aspecto econômico, uma vez que a quantidade de enzimas empregada no seu preparo é dez vezes maior que a dos demais hidrolisados. Entretanto, o seu teor elevado de aminoácidos livres poderia levar a uma maior remoção de Phe. Assim sendo, esta preparação deve também ser testada quanto ao desenvolvimento de formulações dietéticas para fenilcetonúricos.

Comparando-se os resultados da Tabela 3 com os obtidos em outros trabalhos, nos quais uma enzima de origem microbiana foi empregada isoladamente e em associação com outra enzima, verifica-se uma certa semelhança. Assim, CHATAUD *et al.* (1988) relataram a superioridade da associação enzimática da tripsina com duas enzimas de origem bacteriana, em relação à ação isolada da tripsina, obtiveram um hidrolisado contendo 75% de di- e tripeptídeos (F3). CARREIRA *et al.* (2001b) também obtiveram melhores perfis peptídicos de hidrolisados de caseína, do ponto de vista nutricional, quando associaram a pepsina com a tripsina e a subtilisina, do que quando empregaram a pepsina isoladamente. Por outro lado, MORATO *et al.* (2000) observaram que o hidrolisado de caseína obtido pela ação isolada da subtilisina apresentou melhor perfil peptídico em relação ao teor de di- e tripeptídeos, se comparado ao hidrolisado obtido através de sua associação com a tripsina.

Finalmente, é interessante observar que as alterações das condições hidrolíticas empregadas por LOPEZ-BAJONERO *et al.* (1991), foram benéficas (H1) ou desvantajosas (H6), do ponto de vista nutricional. A seguir, será apresentada uma análise detalhada das diversas condições hidrolíticas sobre o perfil peptídico dos hidrolisados testes.

**Tabela 3** Teor de peptídios e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados testes

Hidrolisados	FRAÇÕES			
	F1	F2	F3	F4
H1	26,29 <sup>1/b</sup>	41,72 <sup>1/a</sup>	13,07 <sup>1,2/c</sup>	18,92 <sup>3/b,c</sup>
H2	25,62 <sup>1/a</sup>	32,27 <sup>2/a</sup>	11,27 <sup>1,2/b</sup>	30,84 <sup>2/a</sup>
H3	18,39 <sup>1,2/b</sup>	36,14 <sup>1,2/a</sup>	14,63 <sup>1,2/b</sup>	30,84 <sup>2/a</sup>
H4	14,16 <sup>2/b</sup>	36,02 <sup>1,2/a</sup>	16,24 <sup>1/b</sup>	33,58 <sup>2/a</sup>
H5	25,55 <sup>1/b</sup>	37,80 <sup>1,2/a</sup>	10,92 <sup>1,2/c</sup>	25,73 <sup>2,3/b</sup>
H6	6,18 <sup>3/c</sup>	18,74 <sup>3/b</sup>	6,35 <sup>2/c</sup>	68,73 <sup>1/a</sup>

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

## COMPARAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS

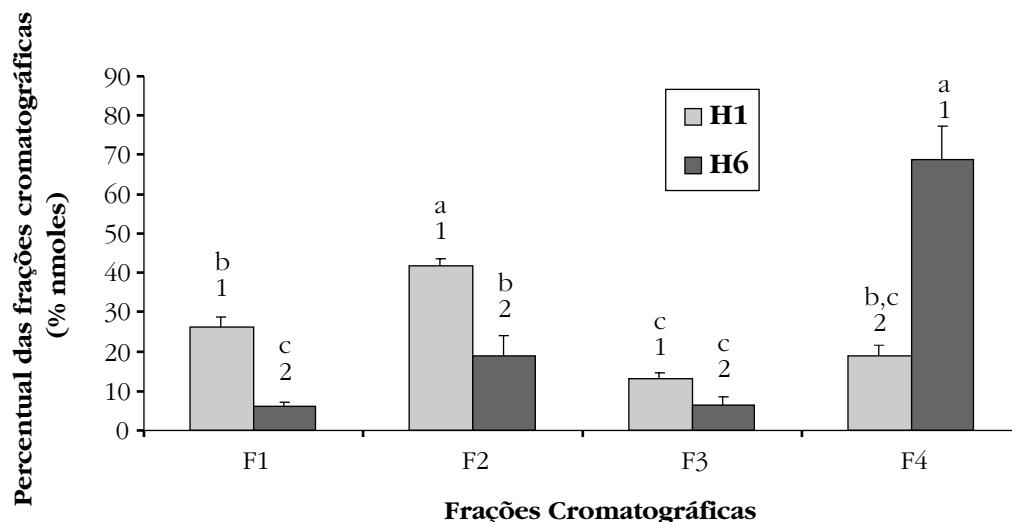
Não foram encontrados dados na literatura abordando o perfil peptídico obtido da hidrólise enzimática do leite em pó desnatado. Este alimento é constituído de uma mistura de vários nutrientes. Entre as proteínas, cerca de 80% é representado pela caseína. Portanto, a seguir serão feitas comparações com trabalhos que prepararam o perfil peptídico a partir da caseína.

## EFEITO DA RELAÇÃO E:S

A influência da relação E:S na ação da AO e da PA sobre leite em pó desnatado pode ser avaliada na Figura 4.

Aumentando-se dez vezes a relação E:S das duas enzimas, de 1% para 10% para AO e de 2% para 20% para PA (hidrolisados H1 e H6, respectivamente), observou-se uma alteração significativa no conteúdo de todas as frações cromatográficas, produzindo um perfil peptídico de qualidade nutricional inferior. Houve diminuição dos níveis de médios, di- e tripeptídeos, assim como aumento do teor de aminoácidos livres. A única alteração vantajosa, do ponto de vista nutricional, refere-se ao decréscimo no conteúdo de grandes peptídios (Tabela 3). Este grande aumento da E:S, ao invés de promover a hidrólise dos grandes e médios peptídios a di- e tripeptídeos, levou à hidrólise destes a aminoácidos livres. Isto poderia estar associado, pelo menos em parte, ao fato de que

a 10% e 20%, levou apenas à pequena formação de di- e tripeptídeos contendo fenilalanina como segundo aminoácido, a partir da porção carboxi-terminal, os quais, de acordo com LENIER (1974) e REED (1975), não serviriam de substratos para a ação da papaína. Além disto, este aumento da relação E:S seria inadequado, do ponto de vista econômico, devido ao custo, principalmente das enzimas, se for considerado uma produção em larga escala.



**Figura 4** Teor de aminoácidos das frações cromatográficas de hidrolisados de leite em pó desnatado, obtidos da ação associada da protease do *Aspergillus oryzae* e da papaína: efeito da relação E:S. H1: 1% e 2%; H6: 10% e 20%. F1: grandes peptídios (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de diferentes frações de um hidrolisado.

Outros trabalhos também relataram o efeito da relação E:S sobre os teores de peptídios em hidrolisados protéicos sendo que, em alguns casos, os resultados foram benéficos e, em outros, prejudiciais para o perfil peptídico. Assim, LOOSEN *et al* (1991) testaram o emprego da subtilisina na hidrólise da caseína, variando-se a relação E:S de 1 a 4%, obtendo os melhores resultados empregando-se a relação E:S de 2%, que levou à obtenção de um hidrolisado contendo 75% de di- e tripeptídeos e apenas 5% de aminoácidos livres.

MORATO *et al* (2000) estudaram a ação da subtilisina isoladamente, e associada à tripsina, sobre a caseína. O aumento da relação E:S de 2% para 4% para a subtilisina, usada isoladamente, apresentou alteração significativa em todas as frações, com um

decréscimo dos teores de grandes peptídios e aminoácidos livres, e um aumento do conteúdo de médios e também de di- e tripeptídeos. Porém, quando usaram a subtilisina associada à tripsina sobre a caseína, ao aumentar a relação E:S das enzimas de 2% para 4% para a subtilisina e de 10% para 20% para a tripsina, estes autores obtiveram uma alteração desvantajosa do perfil peptídico dos hidrolisados, uma vez que houve um decréscimo no conteúdo de di- e tripeptídeos enquanto que as outras frações mantiveram-se constantes. CARREIRA *et al* (2001b), ao utilizar a caseína como substrato, observaram que alterando-se a relação E:S da pepsina, nas mesmas proporções que a tripsina (de 2% para 4%), não houve diferença significativa nas frações F1, F2 e F4. Entretanto os autores observaram um aumento significativo na fração F3 (di- e tripeptídeos) de 2% para 10%. MORAIS *et al* (2002) aumentaram a relação E:S da papaína, de 2% para 4%, e obtiveram alterações em todas as frações cromatográficas, produzindo um hidrolisado de caseína com perfil nutricional de pior qualidade, com redução do teor de F3 de 20% para 9% e um aumento no teor de aminoácidos livres de 7% para 29%.

GONZÁLEZ-TELLO (1994), por outro lado, contradiz estes resultados quando afirma que uma alteração na relação E:S não exerce qualquer influência na distribuição de peptídios nas frações cromatográficas de hidrolisados protéicos. Existem relatos na literatura que confirmam esta observação. Assim, FREITAS *et al.* (1993) não obtiveram alteração do perfil cromatográfico de um hidrolisado de caseína, ao aumentar 3,7 vezes a concentração de pancreatina. Segundo os autores, este limite aparente na hidrólise da caseína, poderia estar relacionado, pelo menos em parte, à sua seqüência de aminoácidos e à especificidade das enzimas empregadas. Apesar destes resultados concordarem com a afirmação de GONZÁLEZ-TELLO (1994), uma explicação para isso seria a de que os suportes cromatográficos, empregados por FREITAS *et al.* (1993) foram ineficientes para a separação de peptídios, de acordo com o tamanho da cadeia, especialmente de di- e tripeptídeos (KOPACIEWICZ e REGNIER, 1982; LEMIEUX *et al.*, 1991).

## **EFEITO DO TEMPO DE AÇÃO DAS ENZIMAS**

### **AUMENTO DO TEMPO DE AÇÃO DE APENAS UMA ENZIMA (PROTEASE DO *ASPERGILLUS ORYZAE*)**

O efeito do aumento do tempo na ação da AO sobre o leite em pó desnatado está apresentado na Figura 5. Mantendo-se o tempo total de reação em 25h, estudou-se o efeito do aumento do tempo da ação da AO, com a conseqüente redução do tempo de ação da PA.

Quando o tempo de atuação da AO foi aumentado de 5h (H3) para 15h (H4), nota-se uma pequena melhora no perfil peptídico, uma vez que o teor de grandes peptídios foi reduzido de 18,39% para 14,16%. Entretanto, não houve alteração significativa nos teores das outras frações (F2, F3 e F4).

MORATO *et al* (2000) estudaram o tempo de ação da subtilisina (de origem microbiana) e da tripsina sobre a caseína. Quando a subtilisina foi adicionada antes da tripsina, o aumento do tempo de ação da primeira enzima de 5min para 2h30m foi prejudicial, pois

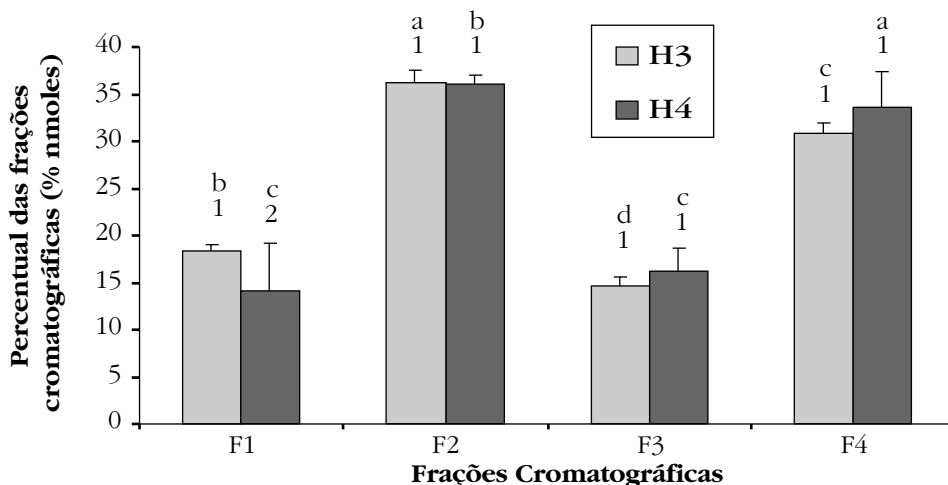
ocasionou um aumento no teor de grandes peptídios e uma redução do conteúdo de di- e tripeptídeos, porém, o teor de aminoácidos livres manteve-se constante. Aumentando-se ainda mais o tempo de atuação da subtilisina, de 2h30m para 4h55m, melhorou o perfil peptídico, considerando-se a elevação do conteúdo de pequenos peptídios (de 12% para 19%).

Em outro estudo, sobre o aumento do tempo de ação de apenas uma das enzimas, CARREIRA *et al.*(2001a) alteraram a ordem de adição da pepsina e da tripsina, aumentando-se o tempo apenas da pepsina. Quando a pepsina foi adicionada antes da tripsina, o aumento do tempo de ação da pepsina de 2h para 3h, levou a um aumento nos teores de grandes peptídios e uma diminuição no conteúdo de médios peptídios e de aminoácidos livres. Os teores de di- e tripeptídeos não variou. Assim, o aumento do tempo de ação da pepsina não melhorou o perfil peptídico destes hidrolisados. Quando a tripsina foi adicionada antes da pepsina, houve, também, um efeito negativo no valor nutricional, uma vez que, o aumento do tempo de ação da pepsina de 2h para 3h levou a uma redução significativa no teor de di- e tripeptídeos (de 24% para 5%).

Estes resultados sugerem, que, nem sempre o aumento do tempo de ação da enzima pode ser benéfico para o perfil peptídico. Torna-se importante, um estudo detalhado para cada caso, avaliando-se também as vantagens e desvantagens do ponto de visto econômico.

### **AUMENTO DO TEMPO DE AÇÃO DAS DUAS ENZIMAS (PROTEASE DO *ASPERGILLUS ORYZAE* E DA PAPAÍNA)**

O efeito do aumento do tempo na ação da AO e da PA sobre o perfil peptídico do leite em pó desnatado está apresentado na Figura 6. Observa-se que dobrando-se o tempo de ação das duas enzimas, de 1h para 2h (AO) e de 4h para 8h (PA), hidrolisados H1 e H2, respectivamente, não favoreceu o perfil peptídico, do ponto de vista nutricional, uma vez que levou a um aumento (em quase 40%) de aminoácidos livres, uma redução de médios peptídios e não houve alterações nos teores de grandes, e de di- e tripeptídeos. Aumentando-se, ainda mais, o tempo de ação das duas enzimas, de 2h para 5h (AO) e de 8h para 20h (PA), hidrolisados H2 e H3, respectivamente, produziu uma pequena melhora do perfil peptídico, já que houve uma redução dos teores de grandes peptídios. CARREIRA *et al.* (2001a) empregaram a pepsina e a tripsina na hidrólise da caseína. Estes autores mostraram que quando a pepsina foi adicionada antes da tripsina, o aumento no tempo de ação da pepsina de 1h para 2h e da tripsina de 2h para 3h, provocou uma redução nos teores de grandes peptídios, um aumento dos teores de médios peptídios e de aminoácidos livres e não houve diferença em relação aos níveis de di- e tripeptídeos. Nas outras condições estudadas, nas quais a pepsina foi a segunda enzima a atuar, o aumento de 1h para 2h no tempo de ação desta enzima e de 2h para 3h no tempo de ação da tripsina, não apresentou qualquer vantagem do ponto de vista nutricional, uma vez que resultou em uma elevação do teor de aminoácidos livres.



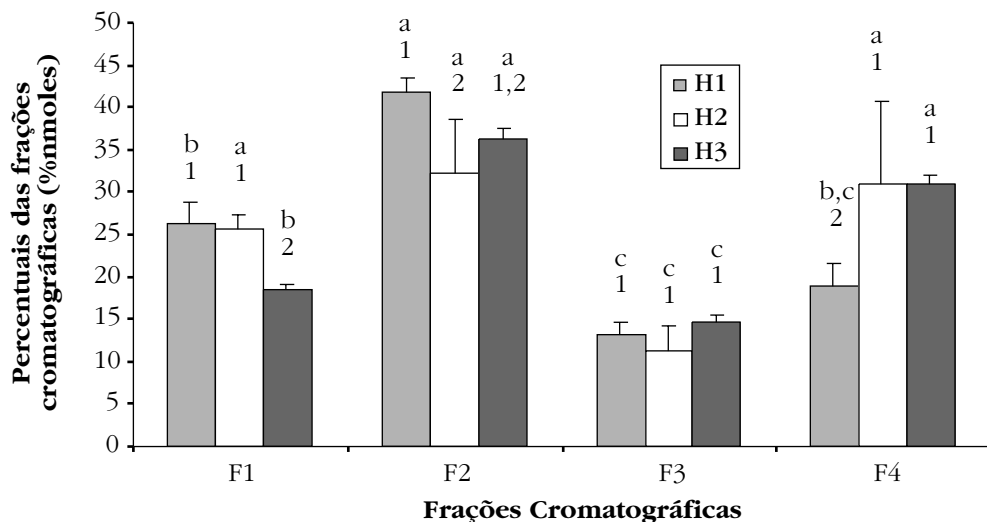
**Figura 5:** Teor de aminoácidos das frações cromatográficas de hidrolisados de leite em pó desnatado, obtidos da ação associada da protease do *Aspergillus oryzae* (AO) e da papaína (PA): efeito do aumento do tempo de ação da AO. H3: 25h (5h AO + 20h PA); H4: 25h (15h AO + 10h PA). F1: grandes peptídios (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livre. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de diferentes frações de um hidrolisado.

Estes resultados indicam que, pelo menos nestes casos, o aumento do tempo de ação das enzimas não produz melhora significativa no valor nutricional dos hidrolisados que, na maioria das vezes, é até reduzida. Além disso, um tempo de reação hidrolítica superior a 5h poderia favorecer a multiplicação microbiana (CHATAUD *et al.*, 1988; LOOSEN *et al.*, 1991).

## CONCLUSÃO

A associação da protease do *Aspergillus oryzae* (AO) com a papaína (PA) mostrou ser ligeiramente mais vantajosa do que a utilização da AO isolada, tendo produzido um perfil peptídico mais adequado às necessidades de dietas especiais. Dentre as associações estudadas, a melhor refere-se à ação de AO por 1h seguida da PA por 4h. Considerando-se a semelhança do perfil peptídico obtido nesta associação com o obtido pela ação isolada da AO, este último tratamento, entretanto, apresenta-se mais vantajoso, do ponto de vista econômico.





**Figura 6** Teor de aminoácidos das frações cromatográficas de hidrolisados de leite em pó desnatado, obtidos da ação associada da protease do *Aspergillus oryzae* e da papaína: efeito do aumento tempo de ação das duas enzimas. H1: 5h (1h AO + 4h PA); H2: 10h (2h AO + 8h PA); H3: 25h (5h AO + 20h PA). F1: grandes peptídios (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livre. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de diferentes frações de um hidrolisado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES

- ADACHI, S.; KIMURA, Y.; MURAKAMI, K.; MATSUNO, R.; YOKOGOSHI, H. Separation of peptide groups with definite characteristics from enzymatic protein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, v.55, n.4, p.925-932, 1991.
- ADIBI, S.A.; MORSE, E.L. Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption. *J. Clin. Invest.*, v.50, p.2266-2275, 1971.
- ADIBI, S.A.; SOLEIMANPOUR, M. R. Functional characterization of dipeptide transport system in human jejunum. *J. Clin. Invest.* v.53, p.1368-1374, 1974.
- ARMSTEAD, I.P.; LING, J.R. Chromatographic separation of mixed peptides from amino acids in biological digests with volatile buffers. *J. Chromatogr.*, v.586, n.3, p.259-263, 1991.
- AUBRY, A.F.; CAUDE, M.; ROSSET, R. Separation and identification of dipeptides in an hydrolyzed brain extract. *Chromatogr.*, v.33, n.3, p.533-538, 1992.
- BOZA, J.J.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; GIL, A. Nutritional and antigenic characterization of enzymatic whey protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.*, v.43, n.4, p.872-875, 1995.

- CÂNDIDO, L.M.B. Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de tilápia do nilo (*Oreochromus niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcionais. Campinas: UNICAMP, 1998. Tese. (Doutorado em Ciência de Alimentos). UNICAMP.
- CARREIRA R.L.; MORAIS, H.A.; BARBOSA, C.M.S.; MOTTA, S.; SILVESTRE, M.P.C. Otimização da hidrólise da caseína para elevar o teores de pequenos peptídeos: associação da pepsina, tripsina e subtilisina. *Braz. J. Food. Tech.*, v.4, n.5, p.103-108, 2001a.
- CARREIRA R.L.; ORNELLAS, C.B.D.; MORAIS, H.A.; MOTTA, S.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M. P. C. Otimização da hidrólise da caseína para elevar o teor de pequenos peptídeos: emprego da pepsina. *Arch. Lat. Am. Nut.* 2001b (submetido para publicação).
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Sci. Techn.*, v.11, 2000.
- CHATAUD, J.; DESREUMEUX, S.; CARTWRIGHT, T., Procédé de fabrication d'un hydrolysat enzymatique de protéines riche en di- et tri-peptides, utilisable notamment en nutrition artificielle et en diététique. A23J3/00. FR87402837.6, 0.274946A1. 14/12/1987, 20/07/1988. Neuilly-sur-Seine-FR: Laboratório Roger Bellon, 1988.
- DAVIS, M.; LEE, T.D. Analysis of peptide mixtures by capillary high performance liquid chromatography: a practical guide to small-scale separations. *Prot. Sci.*, v.1, p.935-944, 1992.
- ETZEL, M.R.; MADISON, W. Production of kappa-casein macropeptide for nutraceutical uses., *Patents US 5968586, A23J1/2; A23C 9/14; C12C 3/08; A23P 1/00.* 09/10/1997; 19/10/1999. Madison, WI: Winsconsin Alimni Reserch Foundation, 1999.
- FREITAS, O.; PADOVAN, G.J.; VILELA, L.; SANTOS, J.E.; DUTRA DE OLIVEIRA, J.E.; GREENE, L.J. Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition. *J. Agric. Food Chem.*, v.41, n.8, p.1432-1438, 1993.
- FRØKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Techn.*, v.48, n.10, p.86-88, 1994.
- GALLAGHER, J.; KANEKANIAN, A.D.; EVANS, E.P. Hydrolysis of casein: a comparative study of two proteases and their peptide maps. *Int. J. Food Sci. Tech.*, v.29, n.3, p.279-285, 1994.
- 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.
- GOMES, F.P. *Curso de estatística experimental.* 13 ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 476 p.
- GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PAÉZ, M.P.; GUADIX, E.M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular-weight range, *Biotech. Bioeng.*, v.44, n.4, p.529-532, 1994.
- GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSKI JUNIOR., M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v.71, p.65-69, 1986.
- KASAI, T.; SAKAMAKI, T.; KIRIYAMA, S. Modified process for preparation of ozonated casein and nutritional evaluation of the product with rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v.58, n.3, p.451 - 454, 1994.
- KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R.C. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut.*, v.26, p.907-913, 1985.

- KITAGAWA, T.; OWADA, M.; AOKI, K.; ARAI, S.; OURA, T.; MATSUDA, I.; IGARASHI, Y.; TADA, K.; KATAYAMA, S.; HASHIDA, W. Treatment of phenylketonuria with a formula consisting of low - phenylalanine peptide. *Enzyme* v.38, p.321-327, 1987.
- KOPACIEWICZ, W.; REGNIER, F.E. Nonideal size-exclusion chromatography of proteins: effects of pH at low ionic strength. *Anal. Biochem.*, v.126, n.13, p.8-16, 1982.
- LEMIEUX, L.; AMIOT, J. Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography to separation of peptides from phosphorylated and dephosphorylated casein hydrolysates. *J. Chromatogr.*, v.73, n.1, p.189-206, 1990.
- LEMIEUX, L.; PIOT, J.M.; GUILLOCHON, D.; AMIOT, J. Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *J.Chromatogr.*, v.32, n.3, p.499-504, 1991.
- LENIER, I.E. The sulfhydryl proteases. In: WHITAKER, J.R. *Food related enzymes*. Washington: American Chemistry Society, 1974. 374p. Advances in Chemistry Series 136.
- LÉONIL, J.; GAGNAIRE, V.; MOLLÉ, D.; PEZZENEC, S.; BOUHALLAB, S. Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides. *J. Chromatogr. A*, v.881, p.1 - 21, 2000.
- 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.
- LOPEZ-BAJONERO, L.J.; LARA-CALDERON, P.; GALVEZ-MARISCAL, A.; VELASQUEZ-ARELLANO, A.; LOPEZ-MUNGUIA, A. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *J. Food Sci.*, v.56, n.4, p.938-942, 1991.
- MORAIS H. A.; BARBOSA, C.M.S.; LOPES, D.C.F.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Caracterização do perfil peptídico e de aminoácidos em hidrolisados de caseína. *Arch. Lat. Am. Nut.* v.52, n.1, p.77-83, 2002.
- MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J.Food Comp. and Anal.*, v.13, p.843-857, 2000.
- MOSZCZYNSKI, P.; IDZIAC, J. Preparation of enzymatic hydrolysates of casein depleted in phenylalanine. *Applied Biochem. Microb.*, v.29, n.3, p.302-306, 1993.
- OUTINEN, M.T.; TOSSAVAINEN, O.; HARJU, M.; LINKO, P. Method for removing phenylalanine from proteinaceous compositions, a product so obtained and use thereof. *Patents US 5547687, A23J3/34B4; A23J3/34C; A23L1/015E2; A61K38/01B; A61K38/01D6. 12/09/1994; 20/08/1996*. Helsink, Finland: Valio Oy, 1996.
- PARRADO, J.; MILLAN, F.; HERNANDEZ-PINZÓN; BAUTISTA, J.; MACHADO, A. Characterization of enzymatic sunflower protein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, v.41, n.11, p.1821-1825, 1993.
- PEREA, A.; UGALDE, U.; RODRIGUEZ, I.; SERRA, J.L. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: applications in industrial whey bioconversion processes. *Enz. Microb. Technol.*, v.15, n.11, p.418-423, 1993.
- REED, G. *Enzymes in food processing*. 2<sup>nd</sup>ed. New York: Academic Press, 1975. 573p.

- SCHMIDT, D. G., POLL, J.K. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Netb. Milk Dairy J.*, v.45, n.4, p.225-240, 1991.
- 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.2778-82, 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.
- SMITHERS, G.W.; BRADFORD, R.S. New casein products: fresh opportunities for the dairy industry. *Food Res. Quart.*, v.51, n.1, p.92-98, 1991.
- SNOWIEWICKI, J.; JAGIELKA, R.; SHAHIDI, F. Preparation of hydrolysates from bovine red blood cells and their debittering following plastein reaction. *Food Chem.*, v.57, n.3, p.435-439, 1996.
- TESMER, E.; VETTER, M.; RAFFLER, G.; SCHWEIKHARDT, F. Process of making phenylalanine-free food for infants and small children. *Patents* US 1996000682627, A23L 1/305, A23L 1/304; 09/10/1996; 07/04/1998. Friedrichsdorf, Germany: Milupa GmbH & Co. KG, 1998.
- VERNEUIL, B.; BRESSOLIER, P.H.; JULIEN, R. Quantification of amino acids, and di- and tripeptides in nutritional interest protein hydrolysates by ligand exchange chromatography in combination with Edman degradation. *Symposium on purification technologies*, 4<sup>th</sup>, 1990, p.253-258.
- 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.2, p.205-209, 1992.
- ZHANG, Y.; DORJPALAM, B.; HO, C.T. Contribution of peptides to volatile formation in the Maillard reaction of casein hydrolysate with glucose. *J. Agric. Food Chem.*, v.40, n.5, p.2467-2471, 1992.

Recebido para publicação em 26/07/02. Aprovado em 06/12/02.