

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADO PANCREÁTICO DE ISOLADO

Parecer

PROTEICO DE SOJA PARA NUTRIÇÃO CLÍNICA

*Este exemplar corresponde a redação final da
tese defendida por Flávia Maria Netto e apro-
vada pela comissão julgadora em 16/11/92.*

Netto

FLAVIA MARIA NETTO

Eng^a de Alimentos

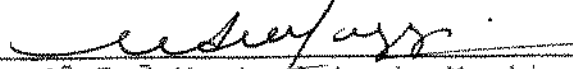
Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Antonia Martins Galeazzi *

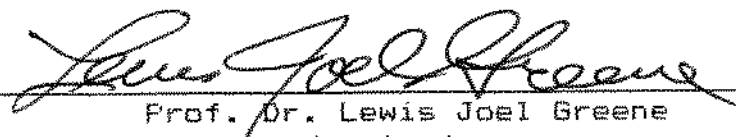
Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Univer-
sidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em
Ciência de Alimentos.

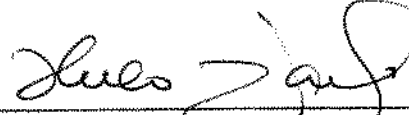
1992


UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

BANCA EXAMINADORA


Profª Drª Maria Antonia Martins Galeazzi
(orientadora)

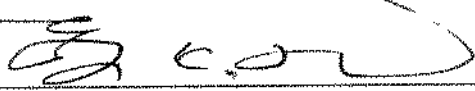

Prof. Dr. Lewis Joel Greene
(membro)


Prof. Dr. Hélio Vanucchi
(membro)


Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán
(membro)

Suplente
Prof. Dr. Arlindo Moreira Salles
(membro)

Suplente
Profª Drª Elza Cotrin Soares
(membro)


Prof. Dr. Yon Kun Park
(membro)

Campinas, 10 de novembro de 1992.

Ao Mauro

AGRADECIMENTOS

A Prof^ã. Dr^ã Maria Antonia Martins Galeazzi pela orientação e amizade.

A Prof^ã. Dr^ã Débora de Queiroz Tavares pela orientação nas análises histológicas.

A Prof^ã. Maria Regina Barbieri de Carvalho pelo auxílio nas análises de inibidores de tripsina.

Ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri pelas facilidades laboratoriais.

A Liana C. Dawood pela colaboração e amizade.

A . Cristina Boccato Ferreira, Yara Fagnani Honório, Aracilda Vitorino e Eliete de Carvalho Leite pela valiosa colaboração para o desenvolvimento do trabalho.

A SANBRA S/A pelo fornecimento dos isolados protéicos de soja.

A Associação Brasileira de Indústrias de Alimentação pelo fornecimento das cópias da Tese.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

INDICE GERAL

INDICE DE TABELAS.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMO	vii
SUMMARY.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	
2.1. Isolado protéico de soja.....	5
2.2. Valor nutricional da proteína de soja.....	6
2.3. Utilização de enzimas proteolíticas em alimentos.....	11
2.4. Modificações enzimáticas de proteínas.....	12
2.4.1. Utilização de hidrólise enzimática na modifica- ção das propriedades funcionais das proteínas...	15
2.4.2. Utilização nutricional de hidrolisados protéi- cos.....	18
2.5. Avaliação nutricional de hidrolisados protéicos.....	22
2.6. Processos utilizados na obtenção de hidrolisados enzimá- ticos de proteína.....	28
2.7. Hidrolisados protéicos em produtos formulados.....	29
3. MATERIAL E METODOS	
3.1. Material.....	32
3.2. Métodos	
3.2.1. Determinações químicas e bioquímicas	
3.2.1.1. Nitrogênio.....	32
3.2.1.2. Proteína.....	33
3.2.1.3. Minerais.....	33
3.2.1.4. Atividade do inibidor de tripsina.....	33
3.2.1.5. Fitato.....	33
3.2.1.6. Aminoácidos totais.....	34
3.2.1.7. Aminoácidos livres.....	34
3.2.1.8. Atividade da pancreatina.....	35

3.2.1.9. Grupos amino-livres.....	35
3.2.2. Hidrólise do isolado protéico de soja com pancreatina.....	35
3.2.2.1. Determinação do grau de hidrólise (GH)..	36
3.2.2.2. Determinação do nitrogênio solúvel em TCA.....	37
3.2.2.3. Modificação do comprimento da cadeia peptídica durante a hidrólise (CMP).....	37
3.2.3. Obtenção do hidrolisado protéico.....	37
3.2.4. Caracterização do hidrolisado.....	38
3.2.4.1. Cromatografia de exclusão em gel.....	39
3.2.4.2. Estimativa do comprimento da cadeia peptídica (CCP).....	39
3.2.5. Ensaio Biológicos	
3.2.5.1. Animais e condições experimentais.....	40
3.2.5.2. Preparo das dietas.....	40
3.2.5.3. Determinação do coeficiente de utilização protéica (PER) e PER corrigido.....	41
3.2.5.4. Determinação da digestibilidade aparente (Da), valor biológico aparente (VBa) e utilização líquida de proteína (NPU).....	41
3.2.5.5. Ensaio Biológico I.....	45
3.2.5.6. Ensaio Biológico II.....	45
3.2.5.7. Ensaio Biológico III.....	47
3.3. Análise estatística.....	47

4. RESULTADOS

4.1. Hidrólise enzimática do hidrolisado protéico de soja (IPS) com pancreatina.....	48
4.1.1 Curvas de hidrólise.....	48
4.1.1.2. Influência da concentração de substrato na curva de hidrólise.....	51
4.1.1.3. Efeito da concentração de enzima.....	54
4.1.2. Obtenção do hidrolisado.....	57
4.2. Caracterização bioquímica do isolado protéico de soja (IPS), do hidrolisado HI (baixo PM) e do hidrolisado	

Ppt (alto PM).....	62
4.2.1. Composição aminoacídica do IPS e dos hidrolisa- dos HI e Ppt.....	62
4.2.3. Presença de fatores anti-nutricionais no IPS e nos hidrolisados HI e Ppt.....	66
4.3. Determinação do perfil de peso molecular do hidrolisa- do protéico.....	68
4.3.1. Cromatografia em Gel.....	69
4.3.2. Análise dos aminoácidos livres e totais das fra- ções obtidas por cromatografia em gel.....	72
4.3.3 Comprimento médio das cadeias peptídicas (CCP) no hidrolisado HI (baixo PM).....	78
4.4. Caracterização Nutricional	
4.4.1. Cômputo químico.....	81
4.4.2. Resultados do Ensaio Biológico I.....	81
4.4.3. Resultados do Ensaio Biológico II.....	87
4.4.4. Resultados de Ensaio Biológico III.....	93
5. DISCUSSÃO	
5.1. Hidrólise enzimática do isolado protéico de soja (IPS) com pancreatina e obtenção de um hidrolisado de baixo peso molecular.....	103
5.2. Caracterização Bioquímica do IPS e dos hidrolisados (bai- xo PM) e Ppt (alto PM).....	110
5.3. Avaliação Nutricional.....	121
6. CONCLUSÕES.....	134
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136

INDICE DE TABELAS

Tabela 1. Formulação da mistura mineral utilizada nos ensaios biológicos (AOAC, 1975).....	42
Tabela 2. Formulação da mistura vitamínica utilizada nos ensaios biológicos, segundo Nutritional Biochemicals Corporation (1977/78).....	43
Tabela 3. Relação entre N solúvel e N total, N solúvel em TCA 10% e N total e N solúvel em TCA 10% e N solúvel obtidas após hidrólise de isolado protéico de soja com pancreatina utilizando condições de hidrólise diversas. ¹	58
Tabela 4. Grau de hidrólise e comprimento médio da cadeia peptídica (CMP) em hidrolisados de baixo PM obtidos pela hidrólise de isolado protéico de soja (Proteimax 90-HE, Proteimax 90-HG e Sanprosoy 90-NB) com pancreatina (condições de hidrólise: em água deionizada, sem controle de pH, T= 37°C, [S]= 5,5%, E/S= 1/35, tempo= 8 horas).....	61
Tabela 5. Composição aminoácídica do isolado protéico de soja (Sanprosoy 90-NB) e dos hidrolisados Ppt (alto PM) e HI (baixo PM) (gaa/16g N) ^{1,2}	63
Tabela 6. Análise de minerais do isolado protéico de soja (Sanprosoy 90-NB) e nos hidrolisados HI e Ppt (mg/g proteína)..	66
Tabela 7. Inibidores de tripsina (IT) determinados em três tipos de isolado protéico de soja (Sanprosoy 90-NB, Proteimax 90-HG e Proteimax 90-HE) e nos hidrolisados HI (baixo PM) e Ppt (alto PM) obtidos a partir destes isolados e ácido fítico para o IPS Sanprosoy 90-NB e hidrolisados HI e Ppt.....	68

Tabela 8. Composição em aminoácidos totais (umol) das frações do hidrolisado HI (44mg de amostra) obtidas por cromatografia de exclusão em gel de Sephadex G-25.....	73
Tabela 9. Distribuição percentual dos aminoácidos (mol %) presentes nas frações do hidrolisado HI obtidas por cromatografia de exclusão em gel de Sephadex G-25 em relação ao total do mesmo aminoácido.....	74
Tabela 10. Composição em aminoácidos livres (umol) das frações do hidrolisado HI (44 mg de amostra) obtidas por cromatografia de exclusão em gel de Sephadex G-25.....	76
Tabela 11. Distribuição percentual dos aminoácidos livres (mol%) presentes nas frações do hidrolisado HI obtidas por cromatografia de exclusão em gel de Sephadex G-25 em relação ao total do mesmo aminoácido na fração - resultados da Tabela 8.....	77
Tabela 12. Distribuição molar dos aminoácidos totais e aminoácidos livres e comprimento médio das cadeias peptídicas (CCP) nas frações obtidas por cromatografia do hidrolisado HI.....	79
Tabela 13. Caracterização do hidrolisado HI em relação ao comprimento médio das cadeias peptídicas.....	80
Tabela 14. Comparação entre a composição em aminoácidos (mg aa/g proteína) da caseína, isolado protéico de soja (Sanprosoy 90-NB) e hidrolisados HI e Ppt, utilizados na preparação da dieta e da proteína padrão segundo a National Research Council (1980).....	82
Tabela 15. Ganho de peso, consumo de proteína e coeficiente de utilização proteica (PER) para o Ensaio Biológico I ^{1,2}	83

Tabela 16. Balanço Nitrogenado (BN), Digestibilidade aparente (Da), Valor Biológico aparente (VBa) e Utilização Líquida de Proteína (NPU) para o Ensaio Biológico I ^{1,2}	86
Tabela 17. Ganho de peso, consumo de proteína e coeficiente de utilização proteica (PER) para o Ensaio Biológico II ^{1,2}	88
Tabela 18. Balanço Nitrogenado (BN), Digestibilidade aparente (Da), Valor Biológico (VBa), Utilização Líquida de Proteína (NPU) para o Ensaio Biológico II ^{1,2}	91
Tabela 19. Altura das vilosidades do íleo dos animais do Ensaio Biológico II ¹	92
Tabela 20. Composição aminoácídica (aminoácidos essenciais) das dietas utilizadas no Ensaio Biológico III e da proteína padrão, segundo a NRC (1980).....	96
Tabela 21. Ganho de peso, consumo de proteína e coeficiente de utilização proteica (PER) para o Ensaio Biológico III ^{1,2}	97
Tabela 22. Balanço nitrogenado (BN), Digestibilidade aparente (Da), Valor Biológico aparente (VBa) e Utilização Líquida de Proteína (NPV) para o Ensaio Biológico III ^{1,2}	101.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma geral para obtenção do hidrolisado.....	38
Figura 2. Curva de Hidrólise: grau de hidrólise (GH) e nitrogênio solúvel em TCA 10%/N total em função do tempo de reação. Condições de hidrólise: IPS-Sanprosoy 90-NB com pancreatina, [S]= 5,5%, E/S= 1/35, T= 37°C, em água deionizada, pH inicial=7,1, sem controle de pH durante a reação, volume de reação= 250 ml.....	49
Figura 3. Correlação entre grau de hidrólise (GH) e N solúvel em TCA 10%/N total. Condições de hidrólise: IPS- Sanprosoy 90-NB com pancreatina, [S]= 5,5%, E/S= 1/35, T= 37°C, em água deionizada, pH inicial= 7,1, sem controle de pH durante a reação, volume de reação= 250 ml.....	50
Figura 4. Modificação do pH em uma reação de hidrólise sem controle de pH, em função do tempo. Condições de hidrólise IPS- Sanprosoy 90-NB com pancreatina, [S]= 5,5%, E/S= 1/35, T= 37°C, em água deionizada, pH inicial=7,1, sem controle de pH durante a reação, volume de reação= 250 ml.....	52
Figura 5. Grau de Hidrólise (GH) em função do tempo com diferentes concentrações de substrato. Condições de hidrólise: IPS- Sanprosoy 90-NB com pancreatina, E/S= 1/35, T= 37°C, em água deionizada, pH inicial= 7,1, sem controle de pH durante a reação. Adição de 1g de pancreatina (E/S= 1/55) após 4 horas (↓).....	53
Figura 6. Comprimento médio da cadeia peptídica (CMP-sem correção para aminoácidos livres) em função do tempo, com diferentes concentrações de substrato. Condições de hidrólise: IPS- Sanprosoy 90-NB com pancreatina, E/S= 1/35, T=37°C, em água deionizada, pH inicial= 7,1, sem controle de pH durante a reação.....	55

- Figura 7. Efeito da concentração de enzima na hidrólise do isolado protéico de soja com pancreatina. Condições de hidrólise: IPS- Sanprosoy 90-NB com pancreatina, T= 37°C, em água deionizada, pH inicial= 7,1, sem controle de pH durante a reação..... 56
- Figura 8. (a) Comparação entre composição aminoacídica do IPS (Sanprosoy 90-NB) e hidrolisados HI e Ppt (%).
 (b) Comparação entre aminoácidos totais e livres presentes no hidrolisado HI (%). 64
- Figura 9. Cromatografia do hidrolisado HI em gel de Sephadex G-25, eluído com ácido acético 5%. Figura superior: medida de absorvância à 570 nm após reação do eluato com ninidrina, com e sem hidrólise alcalina prévia. Figura inferior: medida de absorvância à 280 nm; os números indicam a posição de eluição dos seguintes padrões: (1) albumina bovina, (2) tirosina (3) triptofano; f1 a f6 indicam a divisão em frações de acordo com as características de eluição. 70
- Figura 10. Ensaio Biológico I: Variação do peso médio de ratos Wistar em relação ao tempo em dietas de (1) caseína (CAS), (2) isolado protéico de soja (IPS), (3) hidrolisado HI (baixo PM), (4) hidrolisado enzimático de IPS contendo as frações insolúvel e solúvel (HNS), (5) hidrolisado Ppt (alto PM)..... 85
- Figura 11. Ensaio Biológico II: Variação do peso médio de ratos Wistar em relação ao tempo, submetidos à dieta aprotéica por 15 dias e recuperados com dietas de (1) caseína (CAS), (2) isolado protéico de soja (IPS), (3) hidrolisado HI (baixo PM) e (4) o mesmo hidrolisado suplementado com 0,1% de metionina (HI+Met)..... 89
- Figura 12. Ensaio Biológico II: Cortes histológicos de órgãos de ratos Wistar:

Foto 1. Ileo de rato em dieta de caseína (CAS), criptas (C), (180X)

Foto 2. Ileo de rato em dieta aprotéica por 30 dias, vilosidades (V) com redução da altura, retração do córion das mesmas (↓) (40X).

Foto 3. Ileo de rato recuperado com dieta de isolado proteico de soja (IPS) (90X).

Foto 4. Jejuno de rato recuperado com dieta de hidrolisado de baixo peso molecular (HI) (90X).

Foto 5. Estômago de rato recuperado com dieta de hidrolisado HI (baixo PM). Glândulas fúndicas (↓) com intensa secreção (90X)

Foto 6. Duodeno de rato recuperado com dieta de hidrolisado HI (baixo PM) suplementado com 1% de metionina (HI+Met) (40X)... 94

Figura 13. Ensaio Biológico III: Variação de peso médio de ratos Wistar submetidos em relação ao tempo à dieta aprotéica e recuperados com dietas de caseína suplementada com 0,2% de metionina (CAS+Met) e de hidrolisado de baixo peso molecular suplementado com 0,08% de leucina, 0,14% de valina e 0,3% de metionina (HI+S)..... 98

Figura 14. Ensaio Biológico III: Variação de peso médio de ratos Wistar em relação ao consumo de proteína, após 15 dias em dieta aprotéica, recuperados com dietas de caseína suplementada com 0,2% de metionina (CAS+Met) e de hidrolisado de baixo peso molecular suplementado com 0,08% de leucina, 0,14% de valina e 0,3% de metionina (HI+S)..... 99

RESUMO

A presente pesquisa teve como objetivo estudar a hidrólise de isolado protéico de soja (IPS) com pancreatina para a produção de hidrolisado de baixo peso molecular, bem como a caracterização bioquímica e nutricional dos produtos obtidos. O processo de hidrólise escolhido foi em sistema descontínuo, à 37° C, em água deionizada e sem controle de pH, de modo a minimizar o problema de excesso de eletrólitos no produto final. A reação era interrompida por tratamento térmico, 72° C por 5 minutos, e a separação do material solúvel do insolúvel era feita por centrifugação à 7000g. Após a centrifugação o material obtido era liofilizado, sendo o material solúvel constituído pelo hidrolisado de baixo PM (HI) e o insolúvel, pelo hidrolisado de alto PM (Ppt).

Foram realizados experimentos com diferentes concentrações de substrato (S) e de relação enzima/substrato (E/S) tendo em vista a obtenção de hidrólise extensa do isolado protéico de soja. As condições de hidrólise escolhidas para a produção do hidrolisado foram 5,5% de substrato, relação E/S de 1/35, 37° C, em água deionizada por 8 horas. Sob estas condições, o grau de hidrólise (GH) foi 14,4%, a solubilidade de nitrogênio em TCA 10% em relação ao N total foi de 40,3% e de 73,2% em relação ao N presente no sobrenadante. O pH do sistema, que era 7,1 no tempo zero foi para 6,4, após 8 horas de reação. O hidrolisado HI apresentou 21% de GH e comprimento médio dos peptídeos (sem correção para aminoácidos livres) de 5 resíduos de aminoácidos. Estas características foram consideradas satisfatórias para o objetivo proposto.

O IPS e os hidrolisados obtidos, HI e Ppt, mostraram diferenças em sua composição. Houve decréscimo dos aminoácidos de caráter ácido no Ppt e dos aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina no HI, em relação ao IPS. Os inibidores de tripsina (IT) diminuíram nos hidrolisados em relação ao IPS, apresentando valores de 72,17, 1,18 e 12,14 UTI/mg de proteína para o IPS, Ppt e HI, respectivamente. O hidrolisado HI apresentou 30,74 mg de fitato/g de proteína, estando em menor quantidade na fração Ppt, com 4,95 mg de fitato/g de proteína.

O perfil de peso molecular do hidrolisado HI, obtido por cromatografia em gel de Sephadex G-25, reação com TNBS e análise de aminoácidos livres (AAL) e totais (AAT) mostrou as seguintes características: 23,7% de peptídeos com 18 resíduos, 25,6% de peptídeos com 12 resíduos, 30% de peptídeos com 5 resíduos, 8% com 3 e 0,03% com 2 resíduos de aminoácidos. Os aminoácidos livres foram compostos principalmente por aminoácidos aromáticos e ramificados.

A avaliação nutricional foi realizada através de três ensaios biológicos com ratos Wistar. No Ensaio Biológico I, realizado com animais recém-desmamados, o hidrolisado HI obteve índices de qualidade (PER, NPU e Valor Biológico) menores que IPS e caseína, com exceção da digestibilidade que foi igual para todas as dietas. Nos Ensaio Biológicos II e III, realizados com animais submetidos à 15 dias de dieta aprotéica, observou-se respostas diferentes às dietas experimentais. No Ensaio Biológico II, com relação ao ganho de peso dos animais, o hidrolisado HI apresentou desempenho semelhante às dietas com caseína e IPS nos dois primeiros dias de recuperação. No Ensaio Biológico III, a suplementação do

hidrolisado HI com leucina (0,8%), valina (1,4%) e metionina (3%), feita para suprir os aminoácidos limitantes, resultou em desempenho superior ao da caseína suplementada com metionina (2%) nos primeiros cinco dias de recuperação.

Considerou-se, a partir do exposto acima, que o hidrolisado HI apresentou características de perfil de peso molecular e valor nutricional que indicam sua possível utilização em situações clínicas que requeiram a utilização de fonte protéica modificada, devendo ainda passar por testes clínicos preliminares.

SUMMARY

This work dealt with the pancreatic hydrolysis of soy protein isolates (SPI) for the production of a low molecular weight hydrolysate, as well as the biochemical and nutritional characterization of the product. The selected process was a discontinuous one at 37° C in deionized water and without pH adjustment in order to minimize concentration of inorganic ions in the final product. Hydrolysis was terminated by heat treatment, 72° C for 5 minutes, and separation of the soluble from insoluble material was by centrifugation at 7000g. Both, the soluble, low molecular weight hydrolysate (HI) and the insoluble, high molecular weight hydrolysate (Ppt), were lyophilized.

Various substrates concentrations (S) and enzyme/substrate ratios (E/S) were tested in order to attain extensive hydrolysis of the SPI. Reaction conditions were: 5.5% substrate, E/S= 1/35 (w/w), deionized water, initial pH=7.1, final pH= 6.6, 37° C, duration 8 hours. Under such conditions, the degree of hydrolysis (DH) was 14.4%, nitrogen solubility in 10% TCA was 40.3% and 73.2% with respect to total N and supernatant N, respectively. The HI hydrolysate exhibited 21% DH and mean peptide length of 5 residues (incorrected for free aminoacids), wich were considered satisfactory for the application intended.

Compositional differences were established between the SPI and its hydrolysis products. There was a decrease of acidic amino acids in the Ppt and of the aromatic aminoacids, phenilalanina and tyrosine in the HI hydrolysates, with respect to

the SPI. Trypsin inhibitor activities were 72.17, 1.18 and 12.14 TIU/ mg of protein for SPI, Ppt and HI, respectively. Phytate levels were considerable higher in the HI, 30.74 than in Ppt, 4.95 mg/ g of proteins.

Evaluation of molecular weight profile of the HI hydrolysate, obtained by gel permeation in Sephadex G-25, reaction with trinitrobenzenosulfonic acid (TNBS) and free (AAL) and total (AAT) aminoacid determinations, revealed a content of 23.7% of peptides with 18 residues, 25.6% with 12 residues, 30% with 5 residues, 8% with 3 and 0.03% with 2 residues of amino acids. Free aminoacids were mainly aromatic and branched-chain amino acids.

A nutritional evaluation were carried out using three biologicals assays with Wistar rats. Biological assay I showed that for wealing rats, the HI hydrolysate exhibited lower quality indices (FER, NPU and BV) than SPI and casein, with exception of digestibility, which was the same for all diets. Biological assays II and II were carried out with groups of wealing rats previously submitted to a 15-days non-protein diet. The HI hydrolysate showed a performance similar to that of casein and SPI during the inicial phase of assay II. In assay III, it was shown that supplementation of the HI hidrolysate with 0.8% leucine, 1.14% valine and 3% methionine improved its efficiency above that of casein when supplemented with 2% of methionine, during the initial five days of recovery.

On the basis of the above considerations, it was concluded that the low molecular weight hydrolysate HI, showed molecular weight characteristics and nutritional evaluation results

which indicated the possibility of it being used in clinical situations requiring a modified source of protein.

1. INTRODUÇÃO

Produtos para suporte nutricional, usados em hospitais, foram uma importante contribuição para a medicina nos últimos 40 anos (Schmidl *et alii*, 1989). Os progressos alcançados nesta área são devido, principalmente, aos avanços obtidos no conhecimento da fisiologia humana e da bioquímica, que resultaram em um melhor conhecimento das necessidades nutricionais de pessoas saudáveis ou doentes. Paralelamente, a tecnologia de alimentos possibilitou o desenvolvimento de formulações que atendessem às necessidades específicas de nutrientes nos mais diversos estados fisiológicos.

A demonstração de que o sistema de transporte de peptídios na mucosa intestinal é diferente do sistema de transporte de aminoácidos e que a proteína é absorvida na forma de oligopeptídios bem como na forma de aminoácidos, sugeriu que hidrolisados protéicos deveriam apresentar vantagens fisiológicas em relação aos aminoácidos (Matthews, 1975; Imondi & Stradley, 1974; Silk *et alii*, 1985).

Desta forma, dietas contendo hidrolisados protéicos tem sido utilizadas quando há problemas de digestão ou má-absorção de proteínas. Pessoas com fistulas gastrointestinais, doenças inflamatórias do intestino, síndrome do intestino curto, doença de Chron (Adibi, 1985; Koretz & Meyer, 1980), portadoras de defeitos de metabolismo como mucoviscidose e fenilcetonúria (Marchini *et alii*, 1981) ou ainda no pré e pós operatório de cirurgias de cólon, reto, pescoço e cabeça (Chernoff, 1981), tem se beneficiado destas

dietas.

A partir dos anos 70, já eram comercializadas dietas contendo hidrolisado pancreático de caseína e ovoalbumina (Young *et alii*, 1975). Atualmente, as dietas elementares utilizam principalmente hidrolisados de caseína e lactoalbumina (Koretz & Meyer, 1980; Brady *et alii*, 1986). No Brasil, produtos para nutrição clínica, onde a proteína é fornecida na forma hidrolisada, ainda são pouco disponíveis. Algumas formulações produzidas no país contêm hidrolisado de caseína ou de lactoalbumina, ambos importados, assim como as demais fontes protéicas utilizadas em dietas enterais, com exceção da proteína de soja.

A proteína de soja e seus derivados, tem demonstrado seu alto valor nutricional em ensaios biológicos realizados com ratos ou com homens (Bodwell & Marable, 1981, Beer *et alii*, 1989). Sua utilização na recuperação de indivíduos, com graus variados de desnutrição, tem obtido bons resultados, comparáveis aos da caseína (Torún, 1981). Sua importância na alimentação humana é bastante conhecida (Young, 1991), sendo que avanços tecnológicos no isolamento destas proteínas tem permitido sua utilização em número cada vez maior de produtos. Aplicações de proteína de soja incluem alimentos infantis, formulados hipoalergênicos e outros como na indústrias de carne e panificação (Torún, 1979).

Apesar de suas qualidades nutricionais e de sua ampla utilização em formulados hipoalergênicos e para alimentação enteral, a proteína de soja hidrolisada enzimaticamente não é utilizada na nutrição clínica. Numerosos artigos tem sido publicados sobre a hidrólise enzimática destas proteínas abordando principal-

mente modificações de suas propriedades funcionais (Puski, 1975; Adler-Nissen, 1978, Constantinides & Adu-Amankwa, 1980; Adler-Nissen, 1985). Com exceção de sua utilização na fortificação de refrigerantes (Adler-Nissen, 1985), a utilização nutricional destes hidrolisados é praticamente inexistente.

Grande parte do conhecimento acumulado até hoje sobre produção, caracterização e utilização nutricional de hidrolisados enzimáticos de proteína está centrado na caseína e mais recentemente na lactoalbumina. Estas proteínas, no entanto, apesar de seu reconhecido valor nutricional e da eficácia comprovada de seus hidrolisados na alimentação clínica, são produzidas em escala industrial por grandes produtores de leite, como Estados Unidos e países da Europa.

O Brasil é hoje o segundo produtor mundial de soja, com parque industrial de transformação instalado e consolidado. Produtos como o concentrado e o isolado protéico de soja, tem volume de produção que atende ao mercado interno e externo. A disponibilidade de isolados e concentrados protéicos de soja no Brasil, aliado ao fato da inexistência de produção de proteínas derivadas do leite, caseína e lactoalbumina, tradicionalmente utilizadas para a produção de hidrolisados, bem como a necessidade de diminuir o custo e ampliar o acesso do sistema hospitalar à este tipo de produto levou ao interesse na produção de hidrolisados enzimáticos de proteína de soja.

Tendo em vista o exposto acima, o presente trabalho teve como objetivo estudar a hidrólise do isolado protéico de soja com pancreatina para a obtenção de hidrolisados para utilização na

nutrição clínica, sua caracterização quanto à composição aminiácida, presença de fatores anti-nutricionais, tamanho dos peptídeos presentes e sua eficácia nutricional.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Isolado protéico de soja

Isolado protéico de soja é definido como um produto que tenha não menos que 90% de proteína (Nx6,25), enquanto o concentrado não menos que 70% (Nx6,25) em base seca (Ohren, 1981).

O processo comercial básico para a obtenção do isolado protéico de soja a partir de flocos de soja desengordurados, consiste em uma extração aquosa em pH neutro ou alcalino (pH 9), separação da proteína solúvel do resíduo insolúvel, acidificação do extrato para precipitação da proteína, separação e lavagem do coágulo. Pode-se, neste estágio, secar diretamente a proteína ou neutralizá-la antes da secagem, obtendo-se então o proteinato (Ohren, 1981). Outros processos tem sido estudados como alternativa ao processo clássico, entre eles a utilização de ultrafiltração (Lawhon et alii, 1981).

Antes da secagem, o isolado protéico de soja pode ser submetido à tratamentos químicos, térmicos ou enzimáticos. Estes tratamentos são utilizados para modificação das proteínas com o interesse de obtenção de propriedades funcionais desejáveis (Ohren, 1981).

Constituintes menores acompanham os isolados, como as saponinas, fosfatídeos e fitatos (Snyder & Kwon, 1987). Os carboidratos da soja presentes no isolado protéico de soja ocorrem em menor quantidade que no concentrado ou na farinha de soja, representando menos de 3% de sua composição (Eldridge et alii, 1979).

2.2. Valor Nutricional da Proteína de Soja

A proteína de soja vem adquirindo importante papel na alimentação do mundo ocidental desde os anos 60. Avanços tecnológicos tem permitido que isolados, concentrados e texturizados de proteína de soja sejam amplamente consumidos. Aplicações de proteína de soja incluem formulados infantis, alimentos hipoalergênicos, suplementos protéicos, produtos de panificação, *snacks*, sendo também amplamente utilizada como substituto e *extender* em produtos lácteos, de peixes e carnes processadas (Decker & Kolar, 1979; Torún, 1979). A ênfase dada ao aumento do consumo de alimentos à base de proteínas vegetais em países desenvolvidos e o aumento de produtos feitos à base de proteína de soja, levou a um grande número de pesquisas sobre valor nutricional e problemas relacionados à sua ingestão (Truswell, 1987).

A avaliação da qualidade nutricional de soja e seus derivados tem sido feita tanto em animais, principalmente ratos, como em homens (Bodwell & Marable, 1981; Young, 1991). Existe discrepância na avaliação da qualidade de proteínas em animais e humanos particularmente no caso de proteínas vegetais, onde a metionina é o aminoácido limitante. O valor nutricional de isolados protéicos de soja é estimado em 62 a 72% do PER da caseína, avaliação feita com ratos recém-desmamados e similar ao de leite de vaca, quando avaliados por balanço nitrogenado em crianças e pré-escolares (Young *et alii*, 1979; Torún *et alii*, 1981). De acordo com Young *et alii* (1979) e Scrimshaw & Young, (1979), o isolado protéico de soja é uma proteína totalmente adequada para a nutrição de homens

adultos e sua eficiência nutricional foi avaliada em 95% em relação à carne bovina (Navarrete *et alii*, 1979), 82% em relação ao pescado (Inoue *et alii*, 1981), 79% em relação à proteína de ovo, e entre 91 e 115% em relação ao leite de vaca (Rand *et alii*, 1981). Para homens jovens, o isolado e o concentrado protéico de soja resultaram em balanço nitrogenado semelhante ao da proteína animal de boa qualidade, tanto quando avaliado em um período curto (Istfan *et alii*, 1983^a; Scrimshaw *et alii*, 1983), como por avaliações metabólicas de longo prazo (Istfan *et alii*, 1983b; Beer *et alii*, 1989). Estudos realizados com crianças na idade pré-escolar demonstraram que o isolado protéico de soja é adequado para a sua nutrição (Torún *et alii*, 1981). Mesmo para lactentes, onde o requerimento de aminoácidos sulfurados é mais alto, produtos de soja apresentam menor deficiência de aminoácidos do que seria previsto por experimentos com ratos recém-desmamados (Foman *et alii*, 1979; 1986). Torún *et alii* (1981) concluíram que para uma dieta à base de soja, com ingestão marginal de proteína, apenas uma pequena suplementação com metionina seria necessária para suprir as necessidades protéicas de crianças e adultos. Em um trabalho de revisão recente, Young (1991) concluiu que os aminoácidos presentes na soja, inclusive os sulfurados, suprem os requerimentos nutricionais de humanos nas diferentes faixas etárias sendo a suplementação com metionina necessária, em quantidade reduzida, apenas em formulados infantis.

Torún (1981) relatou que crianças portadoras de desnutrição protéico-calórica recuperaram-se de forma satisfatória com isolado protéico de soja, observando-se recuperação entre 86 e 107% da obtida com a utilização do leite de vaca. Dutra de Oliveira &

Santos (1981) observaram que crianças desnutridas foram recuperadas igualmente com leite de soja e leite de vaca, quando utilizou-se concentração protéica de 3,5%. Para a recuperação feita com dieta contendo 1,5% de proteína, os melhores resultados obtidos foram com leite de vaca, seguido pelo leite de soja suplementado com metionina. O isolado apresentou o pior desempenho, mesmo quando suplementado com metionina. Os mesmos autores consideraram que, sob condições de desnutrição, a proteína de soja é eficiente na promoção da recuperação, sendo também importante na nutrição de crianças e adultos intolerantes à lactose.

Apesar do alto valor nutricional da soja ser determinado largamente pela composição em aminoácidos, o seu potencial nutricional depende da presença de fatores anti-nutricionais presentes (Liener, 1981). Alguns destes fatores são parcial ou totalmente inativados pelo calor durante o processamento. Dentro deste grupo estão os inibidores de tripsina (IT), as hemaglutininas, e fatores anti-vitânicos. Outros não são destruídos pelo calor, como as saponinas, fatores de flatulência e os fitatos, que também podem comprometer a qualidade nutricional da proteína de soja (Young et alii, 1979; Liener, 1981).

Os IT são o fatores anti-nutricionais mais conhecidos e estudados. Na soja são encontrados basicamente dois tipos de inibidores, com propriedades fisicoquímicas e especificidades próprias. O inibidor de Kunitz, que tem PM de 20000 e duas ligações dissulfeto, tem especificidade pela tripsina e é facilmente inativado pelo calor ou pela exposição ao suco gástrico. O inibidor de Bowman-Birk, com PM de 8000 e sete ligações dissulfeto e especifi-

cidade pela tripsina e quimotripsina, é o inibidor potencialmente presente nos produtos de soja, devido à suas características de estabilidade (Liener, 1986). Animais experimentais alimentados com farinha de soja crua apresentam diminuição de crescimento, digestibilidade e retenção de nitrogênio (Nitsan & Liener, 1976), hipertrofia pancreática (Rackis *et alii*, 1975; Liener, 1981) e hiperplasia nodular no pâncreas após 95 semanas de ingestão (Gumbmann *et alii*, 1989). O tratamento térmico adequado da farinha de soja desnatura o IT, aumentando a digestibilidade de nitrogênio e o crescimento dos animais experimentais (Rackis *et alii*, 1975). Contudo, apenas 40% da inibição do crescimento e hipertrofia do pâncreas podem ser creditados aos IT (Liener, 1981), sendo que os 60% restantes devem-se ao fato da proteína de soja, no estado nativo, ser altamente indigerível (Anderson, 1985). Em animais como cães, porcos e bovinos, estes efeitos não são observados (Liener, 1979). Sabe-se que os IT da soja não inibem *in vitro* a tripsina humana (Mossor *et alii*, 1984), mas seus efeitos nutricionais são pouco conhecidos pois sempre foram avaliados em animais experimentais (Liener, 1981). Em trabalho mais recente Liener *et alii* (1988) observaram que o pâncreas humano responde à presença dos IT a soja, à semelhança de diversos animais experimentais, sem no entanto provocar alterações fisiológicas nas condições experimentais utilizadas.

Uma certa quantidade de IT é encontrada e tolerada em produtos comerciais de soja e esta quantidade depende do tratamento térmico efetuado no produto (Rackis *et alii*, 1975; Liener, 1979). Em produtos destinados ao consumo humano o inibidor é praticamente inativo, contendo entre 5 e 20% da atividade do inibidor

de tripsina da soja crua (Liener, 1986). Churella *et alii* (1976), demonstraram que o tratamento envolvido no processamento e esterilização de formulados infantis contendo isolado protéico de soja, reduziu a atividade do IT a 10% da atividade do isolado. A atividade residual não produziu hipertrofia do pâncreas de ratos ou redução de peso do animal. Rackis *et alii* (1975), também observaram que a hipertrofia pancreática não ocorria quando 54% da atividade do IT da soja crua era destruída. O máximo PER obtido pelos autores corresponde à destruição de 80% da atividade do IT da farinha crua.

É bastante conhecido que o requerimento de certos minerais aumenta na presença de soja e seus derivados (Liener, 1981), sendo que a biodisponibilidade de minerais na presença de fitato foi objeto de inúmeras revisões (Cheryan, 1980; Reddy *et alii*, 1982; Wise, 1983). A interação da proteína com o fitato tem sido estudada particularmente nos produtos de soja, apresentando implicações na solubilidade e propriedades funcionais relacionadas (Okubo *et alii*, 1975; 1976; Chen & Morr, 1985) e no valor nutricional das proteínas (Rackis & Anderson, 1977; De Rham & Jost, 1979; Ritter *et alii*, 1987). De Rham & Jost (1979) obtiveram melhor PER para isolados protéicos com menores teores de fitato ao contrário de Churella & Vivian (1989), que não observaram diferença entre dietas com isolado protéico de soja contendo 33 e 3,8 mg de ácido fítico/g de proteína. Saterlee & Abdul-Kadir (1983), mostraram que o efeito do fitato no PER era influenciado pela fonte protéica. O isolado protéico de soja não apresentava variação em seus índices de qualidade protéica na presença de diferentes quantidades de fitato enquanto a proteína de trigo tinha seus índices de qualidade

dul-Kadir (1983), mostraram que o efeito do fitato no PER era influenciado pela fonte protéica. O isolado protéico de soja não apresentava variação em seus índices de qualidade protéica na presença de diferentes quantidades de fitato enquanto a proteína de trigo tinha seus índices de qualidade diminuídos na presença de mesma quantidade de fitato.

2.3. Utilização de enzimas proteolíticas em alimentos

Desde os anos 60, quando as enzimas começaram a ser empregadas como aditivos para detergentes, a utilização comercial de proteinases progrediu rapidamente. As enzimas comerciais de maior importância são as enzimas proteolíticas, que perfazem 60% do total das enzimas comercializadas, sendo que 2/3 são de enzimas microbianas (Kalisz, 1988). As mais importantes sob o ponto de vista econômico são as proteases alcalinas do *Bacillus licheniformis*, utilizadas em detergentes, as *Mucor* proteases usadas na manufatura de queijos e as proteases de *Aspergillus oryzae* utilizados para modificações das propriedades de massa de farinha de trigo e na produção de molho de soja (Godfrey, 1983; Kalisz, 1988). Além das proteinases microbianas, são também amplamente utilizadas proteases de origem animal e vegetal como a renina, pancreatina, malte, papaína. Estas enzimas são utilizadas em processamento de alimentos de importância comercial como cereais, cerveja, chocolate /cacau, vinhos, produtos de ovos, peixe, carne, legumes e hidrolisados protéicos (Kalisz, 1988).

Proteases oferecem diversas vantagens como alternativa de manipulação química e física no processamento de alimentos, sendo sua maior vantagem catalisar reações específicas evitando reações das cadeias laterais que podem ocorrer em processos menos específicos (Kalisz, 1988).

As enzimas são consideradas aditivos alimentares na legislação brasileira (Resolução nº 24/76 da CNNPA), americana (Federal Register, 1988) e inglesa (Cheetam, 1985), devendo atuar na melhoria do processo e da qualidade do produto final. As enzimas proteolíticas permitidas para uso alimentar na legislação brasileira são: (1) de origem animal, obtidas do pâncreas ou do estômago de mamíferos, (2) de origem vegetal, obtidas de plantas da família *Bromilaceae*, do gênero *Ficus* ou do fruto imaturo de *Carica papaya*, (3) de origem microbiana, obtidas do *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *A. flavus oryzae*, *A. saitoi*, *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus*, *M. miyai* ou *M. mihei*.

2.4. Modificação enzimática de proteínas.

A hidrólise enzimática de proteínas pode ter o propósito de alteração e/ou indução de propriedades funcionais desejadas e a produção de peptídeos pequenos e aminoácidos para a utilização em alimentos dietéticos e como flavorizantes (Whitaker & Puigserver, 1982; Kilara, 1985). Hidrolisados tem sido também utilizados na indústria de cosméticos, particularmente em produtos para cabelo e pele (Johnson, 1980).

Adler-Nissen (1985) apontou três utilizações principais dos hidrolisados em sistemas alimentares: (1) aplicações em pequena escala como ingrediente altamente funcional; (2) aplicação em larga escala como *extenders* em produtos cárneos e correlatos e (3) aplicação em concentrações significativas para o aumento da qualidade nutricional. Para estas utilizações, o mesmo autor cita três propriedades dos hidrolisados que devem ser levadas em consideração na sua utilização: (1) propriedades funcionais; (2) propriedades organolépticas e (3) propriedades nutricionais, incluindo neste item possíveis reações fisiológicas adversas, devido a sua ingestão.

Um dos principais problemas em relação à utilização de hidrolisados em alimentos é o aparecimento de gosto amargo devido à proteólise. Carr *et alii* (1956) identificaram como peptídio a substância responsável pelo amargor. Posteriormente, diversos pesquisadores isolaram, à partir de hidrolisados enzimáticos diversos, inúmeros peptídios amargos (Fujimaki *et alii*, 1968; Yamashita *et alii*, 1969; Arai *et alii* 1970a; Fujimaki *et alii*, 1970). Estes trabalhos, entre outros, permitiram estabelecer a natureza geral dos peptídios amargos, que consistia em cadeias contendo entre 2 e 24 resíduos de aminoácidos e grande proporção de aminoácidos hidrofóbicos (Adler-Nissen, 1985). Ney (1971, *apud* Adler-Nissen, 1985) estabeleceu empiricamente, que interações hidrofóbicas eram essenciais para a sensação do gosto amargo e esta sensação era intensificada quando os grupos carboxílicos de aminoácidos hidrofóbicos se encontravam bloqueados pela ligação peptídica (Matoba & Hata, 1972).

Ney (1972, *apud* Adler-Nissen, 1985) postulou que a tendência de uma proteína a formar peptídios amargos poderia ser prevista pela sua composição aminoácídica. Matoba & Hata (1972) e posteriormente Adler-Nissen & Olsen (1979) estabeleceram correlação entre extensão de hidrólise e amargor. A baixa percepção do gosto amargo, em proteínas pouco hidrolisadas, estaria relacionada à capacidade dos peptídios grandes de mascarar, via interação hidrofóbica, as cadeias laterais dos aminoácidos responsáveis pelo gosto amargo. O aumento da hidrólise, com a conseqüente formação de peptídios pequenos, dificultaria as interações hidrofóbicas, resultando na intensificação do gosto amargo.

Tendo em vista a utilização de hidrolisados em sistemas alimentares, inúmeros trabalhos foram realizados com o objetivo de diminuir o gosto amargo. A utilização de adsorventes como carvão ativo (Helbig *et alii*, 1980; Ma *et alii*, 1983), resinas (Lalásides, 1978) e mistura azeotrópica de butanol e água (Lalásides & Sjöberg, 1978) alcançaram resultados satisfatórios na diminuição do gosto amargo, embora com perdas de aminoácidos essenciais. As exopeptidases também tem sido bastante utilizadas na redução do gosto amargo de peptídios. Clegg & McMillan (1974) utilizaram exopeptidases para diminuir o amargor de hidrolisado enzimático de caseína. As carboxipeptidases podem transformar peptídios amargos em não amargos (Arai *et alii*, 1970b; Umetsu *et alii*, 1983). A atividade das carboxipeptidases presentes na pancreatina, também são responsáveis pelo baixo amargor presente em hidrolisados (Lalásides, 1978) assim como as exopeptidases presentes na pronase (Hevia & Olcott, 1977). Minagawa *et alii* (1989) conseguiram diminuir o gosto

amargo de hidrolisados de caseína com a utilização da aminopeptidase T. A reação de plasteína também tem sido estudada como forma para diminuição do gosto amargo (Fujiimaki *et alii*, 1977).

2.4.1. Utilização da hidrólise enzimática na modificação das propriedades funcionais das proteínas

Propriedades funcionais são propriedades físicas, químicas e sensoriais de uma proteína que favorecem o uso desta como ingrediente de um sistema alimentar (Kinsella, 1976). O tratamento para a extração de proteínas envolve, em geral, tratamento ácido ou térmico fazendo com que haja desnaturação e que as propriedades funcionais, antes presentes, desapareçam após a desnaturação. Somente tratamentos mais brandos como a ultrafiltração, permitem que as proteínas conservem suas propriedades, como por exemplo a proteína do soro de leite e o isolado protéico de soja (Kinsella, 1976; Lillford & Wright, 1981). Inúmeras proteínas alimentares não possuem ou necessitam de um incremento ou modificação destas propriedades para serem utilizadas. Kinsella (1976) ressaltaram que muitas proteínas de fontes não convencionais, embora com excelente balanceamento de aminoácidos e outros requisitos nutricionais para serem consideradas proteínas de alta qualidade, não tinham qualquer impacto na nutrição humana por lhes faltarem as propriedades funcionais necessárias à sua incorporação em um sistema alimentar.

A hidrólise, particularmente a enzimática, tem sido utilizada para a modificação de proteínas, produzindo hidrolisados

que auxiliam na formação de espuma e na aeração e que são utilizados na confecção de cremes, pudins e sorvetes (Olsman, 1979). O efeito imediato da reação de hidrólise é o aumento da solubilidade das proteínas, principalmente próximo ao ponto isoelétrico (Hagget, 1974; Adler-Nissen, 1986), seguido pela redução da viscosidade e alterações significativas nas propriedades de emulsificação, gelificação e formação de espuma (Adler-Nissen, 1986), ocasionadas pela diminuição do peso molecular e da estrutura secundária (Chobert *et alii*, 1988a; 1988b). Emulsificação, gelificação e formação de espuma, ao contrário da solubilidade, dependem de uma hidrólise pequena, em torno de 3 a 10% de grau de hidrólise, para ter seus valores efetivamente aumentados (Kinsella *et alii*, 1985). Um dos primeiros trabalhos sobre a utilização da hidrólise enzimática para aumentar as propriedades funcionais das proteínas foi feito por Kumetani & Beeby (1954, *apud* Kinsella, 1976) que produziram um hidrolisado de proteína de leite capaz de substituir a proteína da clara de ovo na produção de merengue.

Embora a proteína de soja apresente uma série de propriedades funcionais (Kinsella, 1979), inúmeros trabalhos foram realizados visando aumento ou modificação destas propriedades. Puski (1975) conduziu um dos primeiros trabalhos sistemáticos sobre as propriedades funcionais do isolado protéico de soja, tendo estudado as modificações da capacidade de emulsificação, gelificação, formação de espuma e absorção de água em relação à extensão da hidrólise provocada pela protease de *Aspergillus oryzae*. Posteriormente, Cowan (1983), para o mesmo sistema proteína-enzima obteve aumento da capacidade de emulsificação e o decréscimo de sua

estabilidade. Segundo o mesmo autor, a proteólise aumenta o número de moléculas de peptídios disponíveis para a interação óleo-água, emulsificando mais óleo e aumentando a capacidade de emulsificação. Inversamente, os peptídios pequenos menos globulares, fazem com que a capa protetora em torno dos glóbulos de gordura seja menos espessa e mais fraca, refletindo em baixos valores para a estabilidade da emulsão. Zakaria & McFeeters (1978) aumentaram a solubilidade do isolado protéico de soja utilizando a pepsina. Pour-el & Swensen (1973, *apud* Adler-Nissen, 1985) utilizaram diversas enzimas para aumentar a capacidade de gelificação do isolado protéico de soja. Olsen & Adler-Nissen (1979), utilizando isolado protéico de soja e a enzima alcalase, sob condições de hidrólise limitada, observaram aumento na capacidade de emulsificação e formação de espuma, concordando com os resultados obtidos por Puski (1975). Adler-Nissen *et alii* (1983), obtiveram boa estabilidade e formação de espuma com a hidrólise limitada de concentrado protéico de soja com alcalase. Mikami *et alii* (1981, *apud* Adler-Nissen, 1985) observaram o aumento da capacidade de emulsificação e formação de espuma de isolado protéico de soja quando submetidos à hidrólise controlada com protease de *Bacillus subtilis*. Mais recentemente, Mietsch *et alii* (1989) estudaram o aumento da capacidade de emulsificação e retenção de água do isolado protéico de soja e das proteínas do leite, utilizando as enzimas alcalase e neutrase.

A caseína e as proteínas do soro do leite tem sido também alvo de inúmeros estudos para a modificação de suas propriedades funcionais. Caseína modificada enzimaticamente foi utilizada na produção de doces (Fox, 1970). A hidrólise controlada da protei-

na do soro do leite com a pepsina aumentou a capacidade de emulsificação e formação de espuma, enquanto a pronase, sob as mesmas condições, causou hidrólise excessiva e perda das propriedades descritas (Kuehler & Steine, 1974). Monti & Jost (1978a; 1978b) observaram grande aumento da solubilidade da caseína hidrolisada com pepsina, sendo que a neutrase e a papaína eram menos eficientes para este fim. A solubilização das proteínas do soro do leite desnaturadas pela ação do calor foi obtida pela hidrólise com protease de *Bacillus licheniformes* (Saint Paul et alii, 1984). Chobert et alii (1988a) estudaram a solubilidade e capacidade de emulsificação da caseína modificada pela protease de *Staphylococcus aureus* V8 e da caseína e proteínas do soro de leite modificadas pela tripsina.

A partir dos anos 60, houve grande interesse na modificação das proteínas de pescado, principalmente para serem utilizadas como suplementação protéica (Adler-Nissen, 1985). Cheftel et alii (1971) e Spinelli et alii (1972) examinaram a capacidade de diversas enzimas hidrolisarem proteína de peixe. A pepsina e a pronase embora sendo mais efetivas na promoção da hidrólise aumentando a solubilidade, não acrescentaram outras propriedades funcionais devido à hidrólise excessiva.

Adler-Nissen (1985), em sua revisão, reporta estudos sobre alterações nas propriedades funcionais de proteínas de gergelim, semente de girassol, folhas, leveduras, amendoim e isolados protéicos de diversas variedades de feijões.

2.4.2. Utilização nutricional de hidrolisados protéicos

A utilização nutricional de hidrolisados protéicos abrange dois aspectos principais: sua utilização na fortificação de alimentos e sua utilização na nutrição clínica.

Os hidrolisados para uso nutricional tem como propriedade funcional desejada a solubilidade. Uma das utilizações mais clássicas de hidrolisados protéicos é na fortificação de refrigerantes (Salunke & Bolin, 1972; Roozen & Filknic, 1975; Adler-Nissen, 1978; Olsen & Adler-Nissen, 1979).

Dietas com nutrientes na sua forma integral (proteínas, lipídios e carboidratos complexos), requerem que o indivíduo esteja com suas funções de digestão e absorção intactas. Mas existem pacientes cuja superfície intestinal e enzimas digestivas são insuficientes para a utilização de nutrientes complexos (Chernoff, 1981; Silk *et alii*, 1985). Nutrientes na forma pré-digerida ou elementar tem sido utilizados como fontes de nutrientes para pacientes que não tem o trato gastro-intestinal intacto e saudável (Chernoff, 1981). Estas dietas são prontas e quase que completamente absorvidas na porção superior do intestino, resultando em quantidades mínimas de resíduos (Young *et alii*, 1975). Entre as situações onde estas dietas tem sido utilizadas com sucesso pode-se destacar o pré e pós operatório de cirurgia de cólon e reto, pescoço e cabeça e na alimentação de pessoas portadoras de fístulas gastrointestinais, doenças inflamatórias dos intestinos, síndrome do intestino curto, pancreatite, obstrução parcial do intestino (Adibi, 1976; Young *et alii*, 1975; Chernoff, 1981). Marchini *et alii* (1981), destacam ainda a importância das dietas elementares para pacientes portadores de doenças hepáticas crônicas, mucoviscidose, várias doenças pediá-

tricas e estados hipercatabólicos. Dietas quimicamente definidas tem sido utilizadas em crianças prematuras de baixo peso ao nascer e portadoras de disfunções do trato gastro-intestinal (Young *et alii*, 1975).

Outra utilização nutricional de hidrolisados protéicos é na alimentação de crianças portadoras de fenilcetonúria, onde há restrição da ingestão de fenilalanina. Hidrolisados com baixas concentrações deste aminoácido tem sido pesquisados (Yamashita *et alii*, 1976; Kimball *et alii*, 1981; Nakhost *et alii*, 1982; Watanabe *et alii*, 1988; Freitas, 1991).

Poucos trabalhos sobre a hidrólise enzimática de proteínas foram realizados tendo como objetivo a utilização dos hidrolisados na nutrição clínica. Em 1951, Hall & Sair (*apud* Adler-Nissen, 1985) obtiveram patente do processo de obtenção de hidrolisado protéico para nutrição clínica, hidrolisando caseína com ficina e posteriormente com leveduras que continham exopeptidases. Clegg & McMillan (1974) e Clegg *et alii* (1974) desenvolveram um processo de hidrólise da caseína utilizando endopeptidase, ficina, e exopeptidases de rim de porco, de forma a obter pequenos peptídeos e aminoácidos livres. Este hidrolisado tinha como objetivo a alimentação de crianças portadoras de mucoviscidose. A importância do uso de hidrolisados na dieta se baseava no trabalho de Winitz *et alii* (1965), que demonstraram que uma dieta composta de aminoácidos e outros nutrientes em sua forma elementar era capaz de manter a saúde. A hidrólise enzimática tinha por objetivo apenas a pré-digestão da proteína, evitando a hidrólise ácida e alcalina que comprometeriam a qualidade nutricional da proteína. Não era ainda con-

siderada a absorção de peptídios como fator importante na absorção intestinal. Lalasides *et alii* (1978) produziram um hidrolisado de baixo peso molecular de proteína de pescado para a nutrição clínica, já tendo em vista as vantagens fisiológicas dos peptídios em relação aos aminoácidos livres (Silk *et alii*, 1973; Imondi & Stradley, 1974; Matthews, 1975). Roger *et alii* (1977) estudaram a hidrólise de lactoalbumina em reator de membrana para a produção de hidrolisados de uso terapêutico. Hernandez & Asenjo (1982) elaboraram um hidrolisado enzimático de leite desnatado que visava a obtenção tanto de pequenos peptídios como a hidrólise da lactose. Segundo Adler-Nissen, (1985) os hidrolisados nutricionais tem como única característica desejada a solubilidade e a qualidade nutricional, já que o aspecto do gosto amargo, típico de hidrolisados protéicos, nem sempre é relevante pois é frequente sua utilização em alimentação enteral. No entanto, a utilização via oral destes produtos, particularmente por pacientes com câncer, levou à preocupação com os aspectos sensoriais (Harrah *et alii*, 1980; Brown *et alii*, 1986; Ovesen & Allingstrup, 1992).

Outro aspecto de extrema relevância em relação aos hidrolisados é a existência de peptídios biologicamente ativos. A digestão luminal das proteínas é considerada completa quando resulta em aminoácidos e peptídios que possam ser absorvidos (Fremann *et alii*, 1979). O aspecto nutricional da proteínas seria, então, suprir o nitrogênio requerido para a biossíntese de tecidos e proteínas de circulação e de ácidos nucleicos. No entanto, novos conhecimentos sobre bioquímica e fisiologia de peptídios, resultantes da ação das proteases no trato gastro-intestinal, mostraram que os

peptídios também tem funções de modulação fisiológica, agindo diretamente como neurotransmissores ou indiretamente, tendo um papel na secreção de hormônios e enzimas dos receptores intestinais (Britton & Koldovsky, 1989; Maubois & Léonil, 1989).

No final da década de 70, foram identificados peptídios com atividade opiácea em hidrolisados pépticos de caseína, de proteínas vegetais como glúten, gliadina, hordeína e proteínas da soja (Zioudrou *et alii*, 1979) e em hidrolisado comercial de caseína (Brandl *et alii*, 1979). Além da atividade opiácea, foram identificadas outras funções dos peptídios, particularmente daqueles derivados das proteínas do leite. Maubois e Léonil (1989) em extensa revisão, relacionaram sequência e papel dos peptídios na nutrição mineral e bioconversão de oligoelementos; na atividade opiácea; como anti-hipertensivo; como imunomodulador e como agente anti-coagulante. Aplicações nutricionais e farmacêuticas destes peptídios, como tratamento de diarréia (casomorfina), má absorção de minerais (caseinofosfopeptídios) ou na imunodeficiência, tem sido consideradas com grande potencial para o futuro, embora ainda haja lacunas no conhecimento destes peptídios (Meisel & Schlimme, 1990).

2.5. Avaliação nutricional de hidrolisados protéicos

Desde a descoberta da treonina em 1935, tem sido demonstrado que seres humanos e animais podem crescer e se manter em balanço nitrogenado positivo com dietas contendo como fonte nitrogenada uma mistura de aminoácidos livres. Greenstein *et alii* (1957) e Winitz *et alii* (1965) desenvolveram dietas completas com aminoá-

cidos livres capazes de manter homens saudáveis em estado nutricional adequado. Na década de 70, o aumento da produção de diversos aminoácidos permitiu a utilização de aminoácidos purificados em dietas para suporte nutricional de pacientes submetidos à cirurgias ou com problemas de digestão e absorção (Itoh *et alii*, 1973).

A substituição da proteína da dieta por uma mistura de aminoácidos suscitou a questão da comparação da eficácia nutricional da proteína integral e de uma mistura equivalente de aminoácidos livres, sem chegar, no entanto, a resultados conclusivos. Watts *et alii* (1964) obtiveram um balanço nitrogenado maior utilizando proteína de ovo do que o obtido pela mistura similar de aminoácidos enquanto Anderson *et alii* (1969), observaram que o balanço nitrogenado em homens adultos saudáveis era igual, quer fossem alimentados com dieta à base de caseína quer à base de mistura equivalente de aminoácidos.

Experimentos mostraram que a utilização de caseína e seu equivalente em aminoácidos livres foram eficientemente utilizados por ratos em crescimento (Sauberlich, 1961) e também por ratos adultos (Metta *et alii*, 1960). Nakagawa e Massana (1971) comprovaram que tanto a caseína intacta como o seu equivalente em aminoácidos livres garantiam o crescimento de animais experimentais. Alguns pesquisadores, no entanto, observaram superioridade da proteína intacta sobre a mistura de aminoácidos (Rama-Rao *et alii*, 1960; Ahrens *et alii*, 1966). Outros autores (Rogers & Harper, 1965; Adkins *et alii*, 1967) compararam caseína intacta com uma mistura diferente de aminoácidos e constataram que ratos alimentados com caseína comiam mais e ganhavam mais peso que os ratos alimentados com mistura

de aminoácidos, fato também observado por Itoh *et alii* (1973).

A eficiência nutricional de mistura de aminoácidos e proteínas intactas também foi determinada utilizando animais e seres humanos que haviam passado por algum tipo de traumatismo. Kishi *et alii* (1978) utilizou ratos enterectomizados (resseção de 65% do intestino delgado) para avaliar a eficiência da dieta tendo como fonte de nitrogênio caseína, uma mistura de aminoácidos equivalente, uma outra mistura diferente do padrão caseína e, ainda, uma mistura de aminoácidos e caseína (25% do N em aminoácidos e o restante em caseína). Para ratos ressecados e não ressecados, a dieta mista de aminoácidos livres e caseína propiciou maior crescimento aliado à maior ingestão, sendo que a extensão da hiperplasia intestinal e a recuperação não foram alteradas pela fonte protéica. Neste mesmo trabalho, constatou-se que a alta osmolaridade das dietas contendo aminoácidos livres era responsável pela baixa ingestão e crescimento dos animais. Itoh *et alii* (1973; 1974) observaram que a substituição de 25% do N fornecido pelos aminoácidos pela caseína intacta fazia com que os ratos ingerissem maior quantidade de alimentos e como consequência apresentavam um maior ganho de peso. A substituição da sacarose pelo amido, com a consequente diminuição da osmolaridade, fez com que o consumo alimentar aumentasse, comprovando o efeito da osmolaridade na utilização da dieta.

Os primeiros trabalhos de avaliação da eficiência protéica de dietas contendo proteína intacta, peptídeos e aminoácidos livres começaram a surgir após o estabelecimento da importância da absorção dos peptídeos e o conhecimento da vantagem cinética destes em relação à velocidade de transporte de aminoácidos. Esta

vantagem existia mesmo em situações em que havia diminuição da capacidade de absorção da mucosa intestinal, como a doença celíaca em adultos não tratados (Crompton *et alii*, 1971; Adibe & Soleimanpur, 1974; Silk *et alii*, 1975; 1979) e decréscimo da capacidade de absorção de aminoácidos mas não de peptídios, em animais que passaram por depleção protéica prolongada (Lis & Matthews, 1972).

Imondi & Stradley (1974) observaram que ratos com insuficiência pancreática (ausência total das enzimas pancreática após o bloqueio do duto) recuperavam peso mais rapidamente quando alimentados com isolado protéico de soja hidrolisado com protease bacteriana do que quando alimentados com dieta contendo aminoácidos livres. Os animais alimentados com proteína intacta, no entanto, não apresentavam ganho de peso, embora as três dietas tivessem composição em aminoácidos praticamente idênticas. Paralelamente, observou-se que os animais com as funções pancreáticas normais, tendo ou não sido operados, tinham crescimento praticamente idêntico com as mesmas três dietas (*ibid.*).

Yamamoto *et alii* (1985) compararam o efeito da caseína, hidrolisado triptico de caseína e mistura similar de aminoácido no metabolismo nitrogenado de ratos em crescimento, em depleção protéica, gastrectomizados (total) e hepatectomizados (parcial). Apenas os animais gastrectomizados apresentaram diferença na recuperação, sendo mais rápida quando alimentados com hidrolisado e mais lenta quando alimentados com caseína. Resultados diferentes foram obtidos por Poullain *et alii* (1989) que observaram que ratos adultos em jejum por 72 horas apresentavam melhor retenção de nitrogênio quando alimentados com hidrolisado de proteína de soro de

leite do que quando alimentados com proteína intacta ou aminoácidos livres (Poullain *et alii*, 1989). Os mesmos autores observaram que o balanço nitrogenado era melhor para ratos alimentados com hidrolisado, independente de seu estado nutricional. Payne & Matthews (1975 *apud* Silk *et alii*, 1985) também haviam observado o efeito benéfico de hidrolisados protéicos na síntese de proteína quando comparado aos aminoácidos livres.

Silk *et alii* (1975) inauguraram uma série de trabalhos que comparavam a eficiência das formas moleculares das fontes protéicas em seres humanos. Neste trabalho foi utilizado um hidrolisado de caseína preparado de acordo com Clegg *et alii* (1974) e mistura equivalente de aminoácidos para administração oral a seres humanos adultos saudáveis. Utilizando a técnica de perfusão intestinal os autores observaram que a absorção de nitrogênio alfa-amino era maior para o hidrolisado que para aminoácidos livres. Posteriormente, Silk *et alii* (1979) observaram que pessoas saudáveis eram capazes de absorver hidrolisado pancreático de proteína de peixe e uma mistura equivalente de aminoácidos com igual eficiência. Moriarty *et alii* (1985) obtiveram resultados semelhantes ao comparar a absorção de lactoalbumina, hidrolisado de lactoalbumina e mistura similar de aminoácidos. Hegarty *et alii* (1982), após comparar o perfil aminoacídico intra-luminal e plasmático após ingestão de proteína intacta, hidrolisada e aminoácidos livres, não encontrou evidências suficientes que indicasse a utilização de peptídios em dietas elementares. Em pacientes portadores de Doença de Crohn e de má absorção, preparações contendo peptídios (Criticare-HN, Mead Johnson Nutritional Division, Evansville, Ind) promoveram

melhor retenção de nitrogênio do que uma preparação contendo aminoácidos livres (High Nitrogen Vivonex) ou alimentos sólidos (Smith *et alii*, 1982).

Fairclough *et alii* (1980) observaram que hidrolisados feitos a partir de matérias-primas e enzimas diferentes eram absorvidas com diferentes velocidades, refletindo também na absorção de água e eletrólitos. Resultados semelhantes foram obtidos por Keohane *et alii* (1985), mostrando que a enzima e a fonte protéica utilizadas na hidrólise influenciavam as propriedades de absorção destes hidrolisados no intestino delgado. Posteriormente o mesmo grupo de pesquisadores (Grimble *et alii*, 1987), utilizando peptídeos obtidos pela hidrólise de proteína de ovo com tripsina, quimo-tripsina, neutrase e alcalase, observaram que o número de resíduos de aminoácidos na cadeia peptídica era o fator que mais contribuía para a velocidade de absorção. Os hidrolisados contendo di e tri-peptídeos eram mais rapidamente absorvidos que aqueles onde havia predominância de tetra e pentapeptídeos. Segundo os mesmos autores, as hidrolases de tetra e penta peptídeos existentes nas microvilosidades limitavam a absorção destes peptídeos, cuja composição simulava o conteúdo do lúmen após a digestão. Adibi & Kim (1981) observaram que a ingestão de hidrolisados poderia inibir as hidrolases de peptídeos da mucosa. Adibi (1985) levantou a possibilidade de utilizar na alimentação enteral uma mistura cristalina de di e tri peptídeos sintéticos de estrutura conhecida, para a eliminação destes problemas.

2.6. Processos utilizados na obtenção de hidrolisados enzimáticos de proteína

Os métodos em uso para obtenção de hidrolisados consistem na utilização de sistemas descontínuos, na utilização de reatores de membrana e na imobilização de enzimas.

Um número muito grande de trabalhos de hidrólise enzimática utilizando reatores com membranas de ultrafiltração foram realizados a partir do início da década de 70. Alguns autores apontaram a otimização da utilização da enzima como a principal vantagem de utilização deste método (Cheftel, *et alii*, 1971; Archer *et alii*, 1973). O fato da membrana permitir a remoção contínua de produtos de reação, peptídios de baixo peso molecular (Deeslie & Cheryan, 1981a; 1981b; 1988), parece ser uma das maiores vantagens, já que a sua presença é a principal causa da diminuição da velocidade de reação quando realizada em sistema descontínuo (Constantinides & Adu-Amankwa, 1980; Adler-Nissen, 1985). Outro aspecto importante em relação aos reatores com ultrafiltração, é a possibilidade de controle, dentro dos limites da membrana, da distribuição de peso molecular (Deeslie & Cheryan, 1981a; Turgeon & Gauthier, 1990). Este controle é de extrema importância pois algumas propriedades funcionais e nutricionais estão estreitamente relacionadas à ele (Adler-Nissen, 1976, 1985).

A solubilização das proteínas de peixe em reator de membrana foi um processo bastante estudado (Cheftel *et alii*, 1971; Archer *et alii*, 1973; Bhumiratana & Amu, 1977). A hidrólise de proteína de soja pelo mesmo processo foi descrita por Roozen &

Pilknik (1975), Olsen & Adler-Nissen (1979), Cheryan & Deeslie (1983), Deeslie & Cheryan (1981a;1981b; 1988). Turgen & Gauthier (1990), desenvolveram um processo de hidrólise de proteínas de soro, onde foram utilizados dois equipamentos de ultrafiltração. O hidrolisado foi separado em peptídios com PM inferior à 10000 daltons, destinado à nutrição clínica, e em peptídios maiores que 10000 daltons, que seriam destinados à utilização em cosméticos ou como produtos funcionais.

Apesar das vantagens oferecidas pelos reatores com membrana como menores gastos com enzimas, controle de peso molecular e a não inibição pelo produto, a grande maioria dos processos de hidrólise enzimática de proteína são ainda feitos em sistema descontínuo (Adler-Nissen, 1985). Alguns problemas relacionados à este método são a utilização de grandes quantidades de enzima, baixo rendimento, a necessidade de inativar as enzimas por tratamento térmico ou alteração de pH e, finalmente, a dificuldade de se obter produtos com pequena variação de peso molecular (Deeslie & Cheryan, 1988). No entanto, a preferência na escolha do método descontínuo em detrimento dos reatores de membrana são de ordem prática como a facilidade na manutenção das condições higiênicas e do controle da cinética de reação (Adler-Nissen, 1985).

2.7. Hidrolisados protéicos em produtos formulados

A utilização de hidrolisados protéicos nas dietas formuladas para nutrição clínica já tem alguma tradição e são produzidos comercialmente (Adler-Nissen, 1985). Na década de 70, Young

et alii (1975) já relatavam a existência de diversas dietas quimicamente definidas sendo comercializadas, onde a fração nitrogenada era composta de aminoácidos sintéticos e de hidrolisados pancreáticos de caseína e albumina de ovo.

Atualmente existem inúmeros produtos que utilizam como fonte protéica, de forma exclusiva ou parcial, hidrolisados de proteínas. Brady *et alii* (1986), listaram uma série de produtos disponíveis para crianças com problemas de má absorção e intolerâncias. As fórmulas com proteínas modificadas, destinadas à crianças alérgicas à proteína de leite de vaca e de soja, incluíam Nutramigen e Progestimil (Mead-Johnson Nutritional Division), contendo hidrolisados de caseína. Também dietas quimicamente definidas como Criticare HN (Mead-Johnson Nutritional Division), contendo caseína hidrolisada e Vital High Nitrogen (Ross Laboratories), contendo hidrolisado de soro de queijo, carne e soja suplementado com aminoácidos essenciais, foram também indicadas para crianças com problemas de digestão e absorção. Estas duas últimas dietas não são específicas para crianças, mas tem ampla utilização na nutrição clínica. No Brasil são encontrados produtos para nutrição clínica contendo hidrolisado de lactoalbumina como fonte protéica exclusiva e também associada à aminoácidos livres (Suppot Produtos Nutricionais).

Até 1972, nos Estados Unidos, as dietas utilizadas por pessoas sob cuidados médicos eram classificadas como drogas, existindo, então, grandes dificuldades para aprovação de novas formulações pelo FDA. Em 1972, muitas drogas receberam a classificação de alimento, ficando sob a jurisdição do *FDA's Bureau of Foods*, ho-

je designado *Center of Food Safety and Nutrition*. Adquiriram status de alimento as formulações hipoalergênicas, hipocalóricas, alimentos para diabéticos e aqueles utilizados para dietas com baixo teor de sódio (Chopra, 1977). Muitos alimentos para alimentação enteral ficaram em uma zona cinzenta, não sendo classificados como drogas ou ainda como alimentos (Schmidl et alii, 1989). No Brasil, a regulamentação destas dietas se deu em 1989 por uma portaria da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária (DINAL), embora algumas formulações já estivessem sendo comercializadas desde o começo da década de 80. Esta portaria definiu alimentos para dieta enteral, sua classificação, fatores essenciais de qualidade e composição, regras para a rotulação e aspectos de industrialização e ainda coloca a necessidade de receita médica para a sua comercialização (DINAL, 1989).

A utilização de hidrolisados enzimáticos de proteínas, denominados peptonas, de tecidos animais, soja, soro, e albumina de ovo é permitida pela legislação americana desde que sejam utilizadas enzimas que sejam consideradas seguras (GRAS- generally recognised as safe) (FDA, 1984, apud Adler-Nissen, 1985). A utilização de hidrolisados protéicos de proteínas de origem animal ou de soja é permitida nas formulações para dietas enterais, sem nenhuma referência aos métodos de obtenção destes hidrolisados (DINAL, 1989).

3. MATERIAL E METODOS

3.1. Material

A matéria-prima usada para a produção de hidrolisados enzimáticos foi o isolado protéico de soja (IPS) produzido pela SANBRA S/A. Foram utilizados três tipos de IPS: Proteimax 90-HE; Proteimax 90-HG; Sanprosoy 90-NB.

A enzima utilizada foi a pancreatina de pâncreas suíno de marca Merck com atividade declarada de 350 FIP/Ug de protease, 75000 U/g de lipase e 7500 U/g de amilase, mantida sob refrigeração durante o período do experimento.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico (p.a.) de diversas procedências.

Para os estudos de caracterização do hidrolisado e ensaios biológicos foram utilizados o Sanprosoy-90 NB e os hidrolisados produzidos a partir desta matéria-prima. Para os ensaios biológicos foi também utilizada caseína comercial fornecida pela NUTRICIA S/A.

3.2. Métodos

3.2.1. Determinações Químicas e Bioquímicas

3.2.1.1. Nitrogênio: determinado pelo método semi-micro Kjeldhal (AOAC, 1975), utilizando óxido de titânio como catalisador (Williams, 1973).

3.2.1.2. Proteína: determinada como proteína total, multiplicando-se a porcentagem de nitrogênio pelo fator de conversão 6,25.

3.2.1.3. Minerais: determinado por espectrofotometria de absorção por plasma com equipamento ARL- modelo ICP 3410, de acordo com as instruções do fabricante. Foram incineradas 10g de amostra à 550°C, as cinzas obtidas foram recuperadas em 2 ml de HCl e 3 ml de HNO₃. Após aquecimento foram filtradas e o volume elevado à 100 ml. A amostra assim preparada foi bombeada para o nebulizador em contato com um fluxo contínuo de argônio.

3.2.1.4. Atividade do inibidor de tripsina: foi utilizada tripsina de pâncreas bovino (Sigma, 12000 BAE) e a determinação foi feita segundo Kakade *et alii* (1969), utilizando BAPNA (hidroclorato de N alfa-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida) como substrato para a tripsina. Uma unidade de tripsina foi arbitrariamente definida como de 0,01 unidade de absorvância a 410 nm em 10 ml de mistura de reação. A atividade do inibidor de tripsina foi definida como o número de unidades de tripsina inibida (UTI).

3.2.1.5. Fitato: determinado de acordo com metodologia descrita por Latta & Eskin (1980) que baseia-se na propriedade do fitato quelar minerais. Para a extração do fitato, as amostras foram diluídas em HCl 0,65 N. A solução foi então centrifugada (11000g por 15 minutos) e eluída em coluna de troca iônica, AG1-X4 da Biorad, para a separação do fitato. A solução contendo fitato, foi adicio-

nado o reagente de Wade ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,03% e ácido sulfosalicílico 0,3% em água destilada) e absorvência lida em 500 nm. A curva padrão foi elaborada à partir de concentrações crescentes de uma solução de fitato de sódio, obedecendo as mesmas condições utilizadas para as amostras.

3.2.1.6. Aminoácidos totais: foram determinados, com excessão do triptofano, utilizando-se o método de resina de troca iônica de Spackman *et alii* (1958), em analisador automático Beckman modelo 119CL, procedendo-se segundo as recomendações da Beckman Instruments (1977). O triptofano foi determinado em analisador de aminoácidos após hidrólise alcalina, segundo o método descrito por Allred & MacDonald (1988). A hidrólise foi realizada com NaOH 4,2 N em presença de 1-octanol, durante 20 horas em estufa à 110°C. Após atingir temperatura ambiente, o material foi diluído em tampão citrato de Na, pH 4,25, e o pH ajustado em 4,25. Após centrifugação à 23000g o material foi analisado em analisador de aminoácidos de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.1.7. Aminoácidos livres: a determinação foi feita para hidrolisados protéicos e frações obtidas na cromatografia de exclusão em gel. O material liofilizado, sem hidrólise prévia em HCl 6 N, foi diluído em tampão citrato pH 2,2 e filtrado em membrana Millipore BSWP 01300. A técnica para determinação dos aminoácidos livres foi a mesma utilizada para a determinação dos aminoácidos totais (item 3.2.1.6.).

3.2.1.8. Atividade da pancreatina: foi determinada utilizando-se uma suspensão de caseína p.a. 2,2% em tampão fosfato 0,1M pH 8 e uma solução de enzima contendo 1mg/ml em mesmo tampão. A atividade proteolítica foi determinada pela adição de 2 ml de solução de enzima à 10 ml de substrato à 37°C e incubado por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 10 ml de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10%. A proteína precipitada foi separada por filtração em papel de filtro e lida a absorvância à 280nm contra o branco. O branco foi preparado misturando-se 10 ml de substrato à solução de TCA e, posteriormente, 2 ml de solução de enzima. A unidade de atividade (UI) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar em 1 minuto proteína solúvel em TCA equivalente à lug de tirosina sob as mesmas condições (Constantinides & Adu-Amankwa, 1980).

3.2.1.9. Grupos amino livres: foram determinados pela reação com ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) segundo metodologia desenvolvida por Adler-Nissen (1979). O padrão utilizado foi a L-leucina. Esta metodologia foi utilizada para acompanhar o reação de hidrólise enzimática bem como para a determinação de grupos amino livres nos hidrolisados produzidos e nas frações obtidas por cromatografia em gel de Sephadex.

3.2.2. Hidrólise do isolado protéico de soja com pancreatina

A hidrólise de IPS com pancreatina foi realizada em sistema descontínuo, em agitadores providos de banho-maria ou câma-

ra termostaticizada para controle de temperatura. Os recipientes utilizados para a hidrólise foram erlenmeyers (500 e 2000ml) providos de aletas laterais de modo a promover agitação adequada à mistura de reação, 250 e 1000ml respectivamente. A reação se deu em água deionizada à temperatura de $37 \pm 2^\circ \text{C}$. O pH inicial de hidrólise foi o da suspensão da matéria-prima em água deionizada. Durante a hidrólise, não houve ajuste do pH.

Foram realizados experimentos de hidrólise onde houve variação da concentração de substrato (peso/volume) e da relação enzima substrato (peso/peso). Todos os experimentos foram realizados em duplicata. O acompanhamento da reação de hidrólise foi feito por um período de 8 horas e, a intervalos regulares, foram retiradas aliquotas para determinação do grau de hidrólise (GH), de nitrogênio solúvel em TCA 10% e variação do comprimento médio das cadeias peptídicas.

3.2.2.1. Determinação do grau de hidrólise (GH): o GH foi definido por Adler-Nissen (1985) como o número de ligações peptídicas clivadas ou número de grupos amino livres formados durante o processo de hidrólise, expresso em equivalente de hidrólise (h) e o número total de ligações peptídicas antes da hidrólise (h total) determinado pela composição em aminoácidos da proteína em mmol/g de proteína. O GH foi calculado segundo a expressão:

$$\text{GH} = \frac{h}{h \text{ total}} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de ligações peptídicas quebradas}}{\text{n}^\circ \text{ total de ligações peptídicas}} \cdot 100$$

3.2.2.2. Determinação de nitrogênio solúvel em TCA: a proteína precipitada por solução de TCA 10% foi centrifugada a 10000g e o nitrogênio do sobrenadante foi determinado pelo método de micro-Kjeldhal.

3.2.2.3. Modificação do comprimento das cadeias peptídicas durante a hidrólise (CMP): para o acompanhamento das modificações das cadeias peptídicas durante a hidrólise foi utilizada a expressão de Adler-Nissen (1985):

$$\text{CMP} = \frac{100}{\text{GH}} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ total de ligações peptídicas}}{\text{n}^{\circ} \text{ de ligações peptídicas quebradas}} \times 100$$

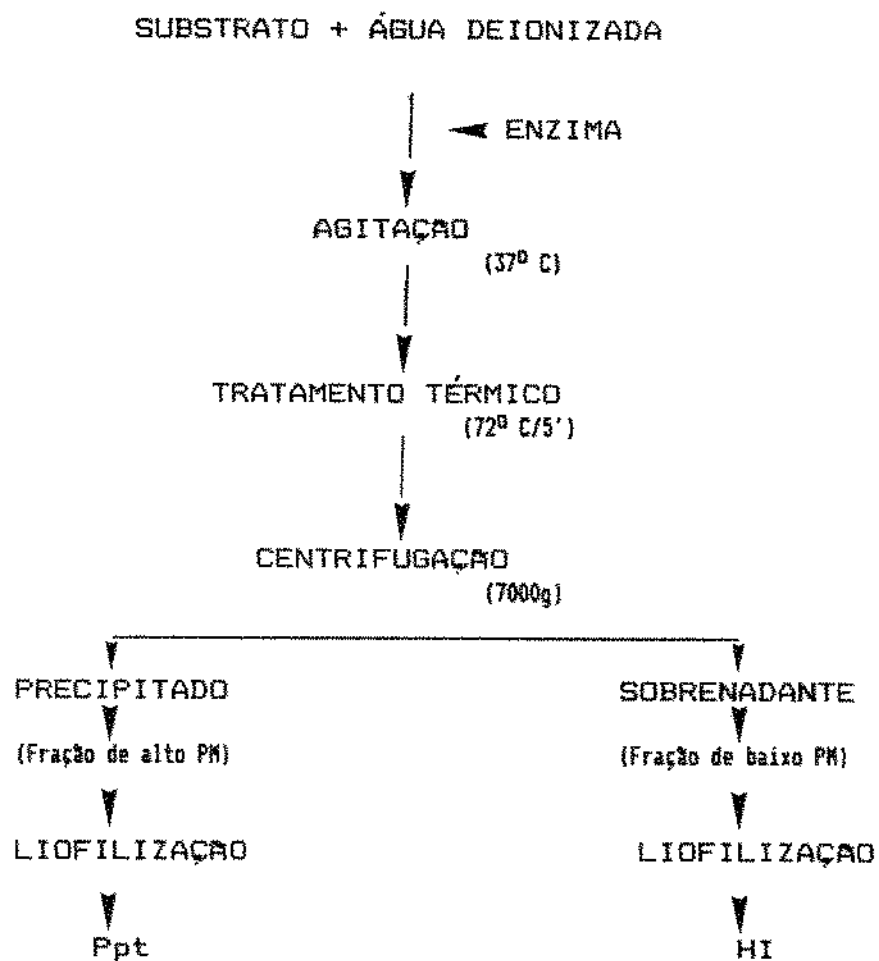
por esta expressão foi feito o cálculo do tamanho da cadeia peptídica, sem correção para os aminoácidos presentes no hidrolisado.

3.2.3. Obtenção do hidrolisado protéico

A obtenção e separação do hidrolisado protéico de IPS com pancreatina foi feita de acordo com o fluxograma geral mostrado na Figura 1.

A reação enzimática foi interrompida por tratamento térmico, 72°C por 5 minutos, de modo a inativar a enzima, facilitar a separação da fração protéica não hidrolisada e promover uma pasteurização do produto. O material foi centrifugado à 7000g por 10 minutos e o sobrenadante, hidrolisado de baixo peso molecular (HI), e o precipitado, hidrolisado de alto peso molecular (Ppt) foram

Figura1. Fluxograma geral para obtenção do hidrolisado



liofilizados. Por vezes o material, após o tratamento térmico, não sofreu separação, sendo liofilizado na forma não separada (HNS).

3.2.4. Caracterização do hidrolisado

3.2.4.1. Cromatografia de exclusão em gel: a cromatografia de exclusão em gel de Sephadex G-25 foi feita em coluna com dimensões de 1,9cm de diâmetro e 62 cm de altura. O eluente utilizado foi o ácido acético 5%, pH 2,5 e amostras de 60 mg de hidrolisado liofilizado foram dissolvidas no eluente com 1M de NaCl de acordo com a metodologia descrita por Lamounier (1984). O fluxo foi de 40 ml/hora sendo coletado 4 ml por tubo. O volume de exclusão (V_0) foi determinado usando Blue Dextran 2000. A análise do efluente da coluna foi feita por absorvância à 280nm e por reação com ninidrina com e sem hidrólise alcalina segundo o método de Hirs (1967). Os padrões utilizados para a calibração da coluna foram albumina de soro bovino, tirosina e triptofano, eluidos sob as mesmas condições empregadas para as amostras.

3.2.4.2. Estimativa do comprimento médio da cadeia peptídica (CCP): o eluato da coluna foi dividido em frações segundo as características do cromatograma obtido, de acordo com a metodologia descrita por Freitas (1984). A concentração molar dos aminoácidos totais (AAT) e livres (AAL) de cada fração foi determinada segundo a técnica descrita nos itens 3.2.1.6. e 3.2.1.7. Para a determinação dos grupos amino livres existente nas frações foi utilizada a técnica do TNBS segundo Adler-Nissen (1979). O CCP foi calculado pela

expressão (Chen et alii, 1962):

$$CCP = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ moles de AAT} - \text{n}^{\circ} \text{ moles AAL}}{\text{n}^{\circ} \text{ moles NH}_2 - \text{n}^{\circ} \text{ moles AAL}}$$

3.2.5. Ensaio Biológicos

3.2.5.1. Animais e condições experimentais

Foram utilizados ratos machos, de linhagem Wistar, provenientes do CEMIB/ Biotério Central da UNICAMP. Os ratos utilizados no Ensaio Biológico I foram animais convencionais e nos Ensaio Biológicos II e III foram animais SPF (livres de germes patogênicos específicos).

Os animais permaneceram durante o período de experimentação em gaiolas individuais, de crescimento ou metabólicas, com comida e água *ad libitum*, em biotério com temperatura ambiente de 23 ± 2 °C e luminosidade controlada (12 horas claro/12 horas escuro).

3.2.5.2. Preparo das dietas

Todas as dietas utilizadas foram preparadas basicamente de acordo com as normas da AOAC (1975) de modo a fornecer 10% de proteína e 8% de óleo. A mistura salina foi preparada segundo a AOAC (1975) e utilizada na proporção de 4% da dieta. A mistura vi-

tamínica, preparada seguindo a formulação da Nutritional Biochemicals Corporation (1977/78), foi utilizada ao nível de 2% da dieta. A adição de fibra, 3% da dieta, foi feita na forma de celulose. A complementação à 100% foi feita com carboidratos, sendo 25% fornecido como sacarose (açúcar refinado) e 75% como amido de milho (Maizena). A formulação da mistura mineral e vitamínica estão nas Tabelas 1 e 2 respectivamente.

3.2.5.3. Determinação do coeficiente de utilização protéica (PER) e do PER corrigido

O cálculo do PER foi feito para cada animal, através do consumo de dieta (quantidade de proteína ingerida) e do ganho de peso, segundo a expressão (Pellet & Young, 1980):

$$\text{PER} = \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{consumo de proteína}}$$

3.2.5.4. Determinação da digestibilidade aparente (Da), valor biológico aparente (VBA) e utilização líquida de proteína (NPU)

Determinadas através do balanço nitrogenado, quando os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais. As fezes e urina foram coletadas separadamente para determinação de nitrogênio. O nitrogênio ingerido foi determinado à partir do consumo da dieta.

Tabela 1. Formulação da mistura mineral utilizada nos ensaios biológicos (AOAC, 1975).

Componente	Porcentagem
Carbonato de Calcio	38,14
Bifosfato de Potassio	38,93
Cloreto de Sódio	13,93
Sulfato de Magnésio	5,73
Sulfato Ferroso	2,70
Sulfato de Manganês	0,40
Sulfato de Zinco	0,05
Sulfato de Cobre	0,04
Cloreto de Cobalto	0,002
Iodeto de Potassio	0,079

Tabela 2. Formulação da mistura vitamínica utilizada nos ensaios biológicos, segundo Nutritional Biochemicals Corporation (1977/78).

Componente	g/kg
Vitamina A (200000 UI/g)	4,5
Vitamina D (400000 UI/g)	0,25
Alfa-tocoferol	5,0
Acido Ascórbico	45,0
Inositol	5,0
Cloreto de Colina	75,0
Menadiona	2,25
Acido p-aminobenzóico	5,0
Niacina	4,5
Riboflavina	1,0
Hidrocloreto de Piridoxina	1,0
Hidrocloreto de Tiamina	1,0
Pantotenato de Cálcio	3,0
Biotina	0,02
Acido Fólico	0,09
Vitamina B-12	0,013
Dextrose	qsp

A digestibilidade aparente foi calculada segundo o descrito por Wolzack *et alii* (1981):

$$Da = \frac{Na}{Ni} \times 100 = \frac{Ni - Nf}{Ni} \times 100$$

onde: Na=nitrogênio absorvido

Ni=nitrogênio ingerido

Nf=nitrogênio fecal

O Valor Biológico aparente foi calculado pela seguinte fórmula:

$$VBa = \frac{Nr}{Na} \times 100 = \frac{Ni - (Nf + Nu)}{Ni - Nf} \times 100$$

onde: Nr=nitrogênio retido

O NPU foi calculado segundo Pellet & Young (1980) de acordo com a expressão:

$$NPU = \frac{Nr}{Ni} \times 100 = \frac{Ni - (Nf + Nu)}{Ni} \times 100$$

Foram realizados 3 ensaios biológicos com características diferentes relatados a seguir:

3.2.5.5. Ensaio Biológico I

Ratos recém desmamados com $48,3 \pm 12,6g$, após 2 dias de adaptação com a dieta de caseína foram colocados em dietas com as seguintes fontes protéicas: caseína (CAS), isolado protéico de soja (IPS) e os hidrolisados enzimáticos de proteína de soja obtidos, conforme descrito no item 3.2.3.2., em sua forma não separada (HNS), fração sobrenadante ou de baixo peso molecular (HI) e fração precipitada ou de alto peso molecular (Ppt). O teor protéico destas dietas variou de 10,04 a 10,59 % (Nx6,25).

O PER foi calculado em relação ao consumo de dieta e ganho de peso em 28 dias de experimentação, de acordo com as normas da AOAC (1975). O balanço nitrogenado foi realizado por um período de 10 dias (entre o 5 e 15 dias). O delineamento estatístico utilizado foi de blocos casualizados, com 6 animais por dieta.

Após o término do experimento, os animais foram sacrificados após anestesia com éter etílico. Todos os animais foram abertos e procedeu-se ao exame macroscópico do trato digestivo e urinário para detecção de eventuais anomalias.

3.2.5.6. Ensaio Biológico II

Neste ensaio foram utilizados ratos recém desmamados, que após 5 dias de adaptação em dieta de caseína alcançaram $75,5 \pm 8,5g$. Os animais foram, então, colocados em dieta aprotéica por 15 dias, exceto um grupo que permaneceu em dieta caseína até o final do experimento. Findo este período, os animais passaram a re-

ceber as dietas de recuperação, contendo como fonte protéica caseína (CAS), isolado protéico de soja (IPS), hidrolisado de baixo peso molecular (HI) e o mesmo hidrolisado suplementado com 1% de metionina (HI+Met). O teor protéico destas dietas variou de 10,77 a 11,80% de proteína (Nx6,25). Um grupo de animais permaneceu em dieta aprotéica até o final do experimento. Foram alocados 6 ratos para cada dieta, segundo delineamento experimental de blocos casualizados.

O PER foi calculado com base no consumo de dieta e ganho corporal dos animais durante os 15 dias em que receberam a dieta de recuperação.

Entre os dias 9 e 14 do período de repleção protéica, fez-se um balanço nitrogenado com objetivo de determinar-se a Da, VBa e NPU.

No final do experimento, os ratos foram sacrificados após anestesia com éter etílico. Estômago, rim, fígado, pâncreas e intestino foram imediatamente retirados e fixados em soluções à base de formaldeído (borin e paraformaldeído, segundo Behmer *et alii*, 1976). Os tecidos foram incluídos em parafina, sendo os intestinos orientados para que a secção fosse, tanto quanto possível longitudinal, possibilitando a medição da altura das vilosidades. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina, tendo-se empregado a técnica do PAS (ácido periódico de Schiff e azul de Alcian) para observar a integridade da bordadura em escova e das células caliciformes.

3.2.5.7. Ensaio Biológico III

A semelhança do ensaio anterior, ratos recém desmamados após 5 dias de adaptação em dieta de caseína, pesando $62,7 \pm 3,8g$, foram submetidos à dieta aprotéica por 15 dias. Após este período, foram separados em 2 grupos de 5 animais, um grupo recebeu dieta com caseína suplementada com 0,2% de metionina (CAS+Met) e o outro ração contendo hidrolisado protéico de soja suplementados com os aminoácidos limitantes metionina, leucina e valina (HI+S). A complementação de aminoácidos foi feita de modo que os dois grupos recebessem quantidades de aminoácidos essenciais que atingissem o requerimento do Nutritional Research Council (1980) .

O PER foi calculado com base no consumo de dieta e ganho de peso dos 15 dias em dieta protéica.

Foi realizado um balanço nitrogenado entre o 7º e 11º dia de repleção protéica, fazendo-se, então, a determinação dos índices relacionados Da, VB e NPU.

3.3. Análise estatística

As médias dos resultados experimentais foram comparadas utilizando análise de variância, teste F, e a comparação entre elas foi feita utilizando-se o teste de Duncan . Na existência de apenas duas médias, foi utilizado o teste t (Cockran & Cox, 1957).

4. RESULTADOS

4.1. Hidrólise enzimática do isolado protéico de soja (IPS) com pancreatina

4.1.1. Curvas de Hidrólise

Os ensaios de hidrólise do IPS com pancreatina foram realizados à temperatura de 37° C em água deionizada, pH inicial 7,1, sem controle de pH durante o curso da hidrólise. A enzima utilizada, pancreatina, apresentou atividade de 92 UI/mg de enzima, determinada utilizando a caseína como substrato.

Na Figura 2 encontram-se curvas de hidrólise típicas obtidas com 5,5% de concentração de substrato (S) e relação E/S de 1/35 (peso/peso), mostrando a evolução do grau de hidrólise (GH) e o aumento do nitrogênio solúvel em TCA em função do tempo de reação. A alta velocidade inicial observada para GH e N solúvel em TCA, diminuiu com o tempo, começando a formar um patamar após 6 horas de hidrólise.

A correlação entre GH e nitrogênio solúvel em TCA 10% (N sol em TCA 10%/N total) foi alta ($r=0,9982$) e significativa ao nível de 0,01% de probabilidade (Figura 3). Este resultado mostra que para as condições e tempo de hidrólise utilizados, estas duas medidas são equivalentes.

O pH inicial 7,1 (IPS em água deionizada) decresceu de maneira acentuada após a primeira hora e meia de hidrólise quando atingiu o valor de 6,6. Em seguida, a queda foi bastante lenta,

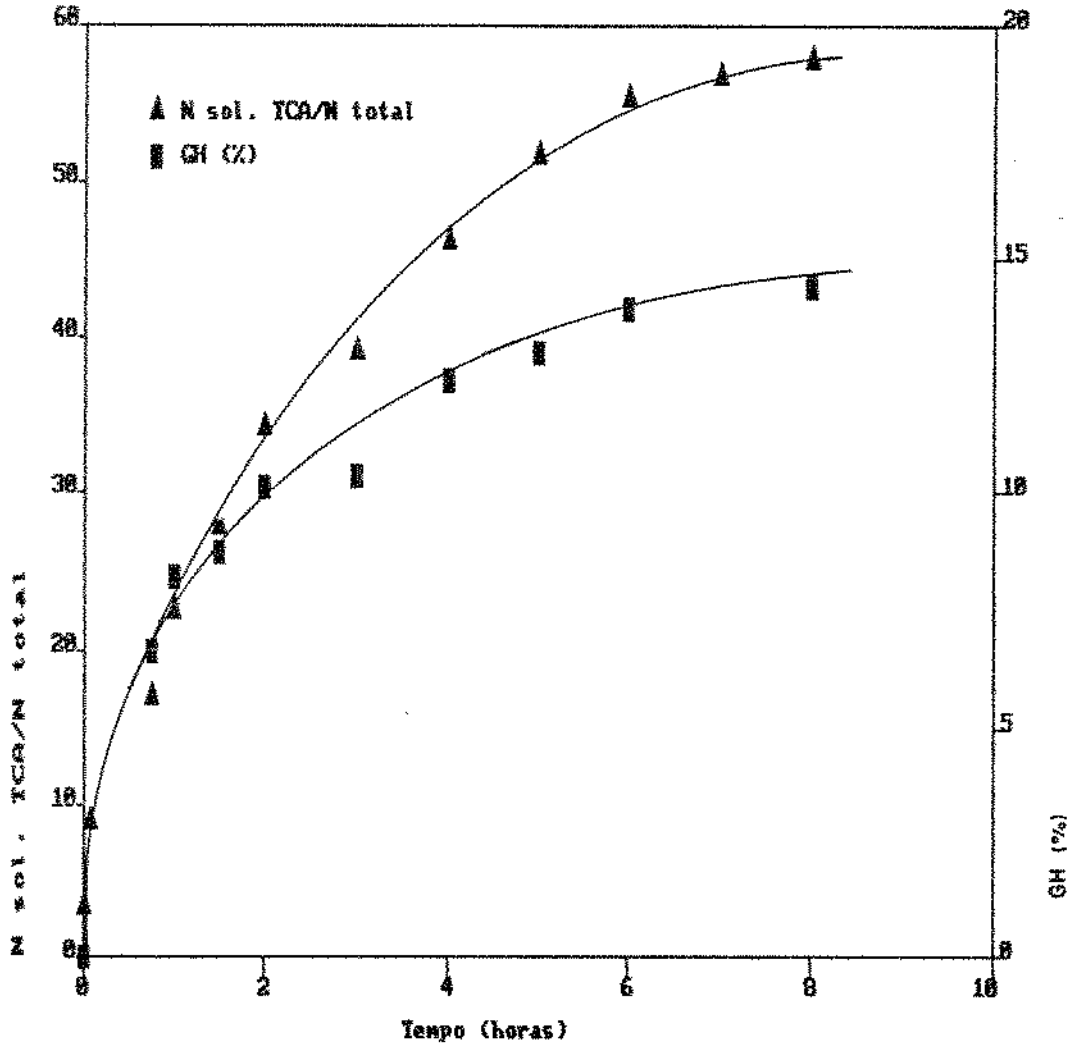


Figura 2. Curva de Hidrólise: grau de hidrólise (GH) e nitrogênio solúvel em TCA 10%/N total em função do tempo de reação. Condições de hidrólise: IPS- Sanprosoy 90-NB com pancreatina, [S]= 5,5%, E/S= 1/35, T= 37°C, em água deionizada, pH inicial=7,1, sem controle de pH durante a reação, volume de reação= 250 ml.

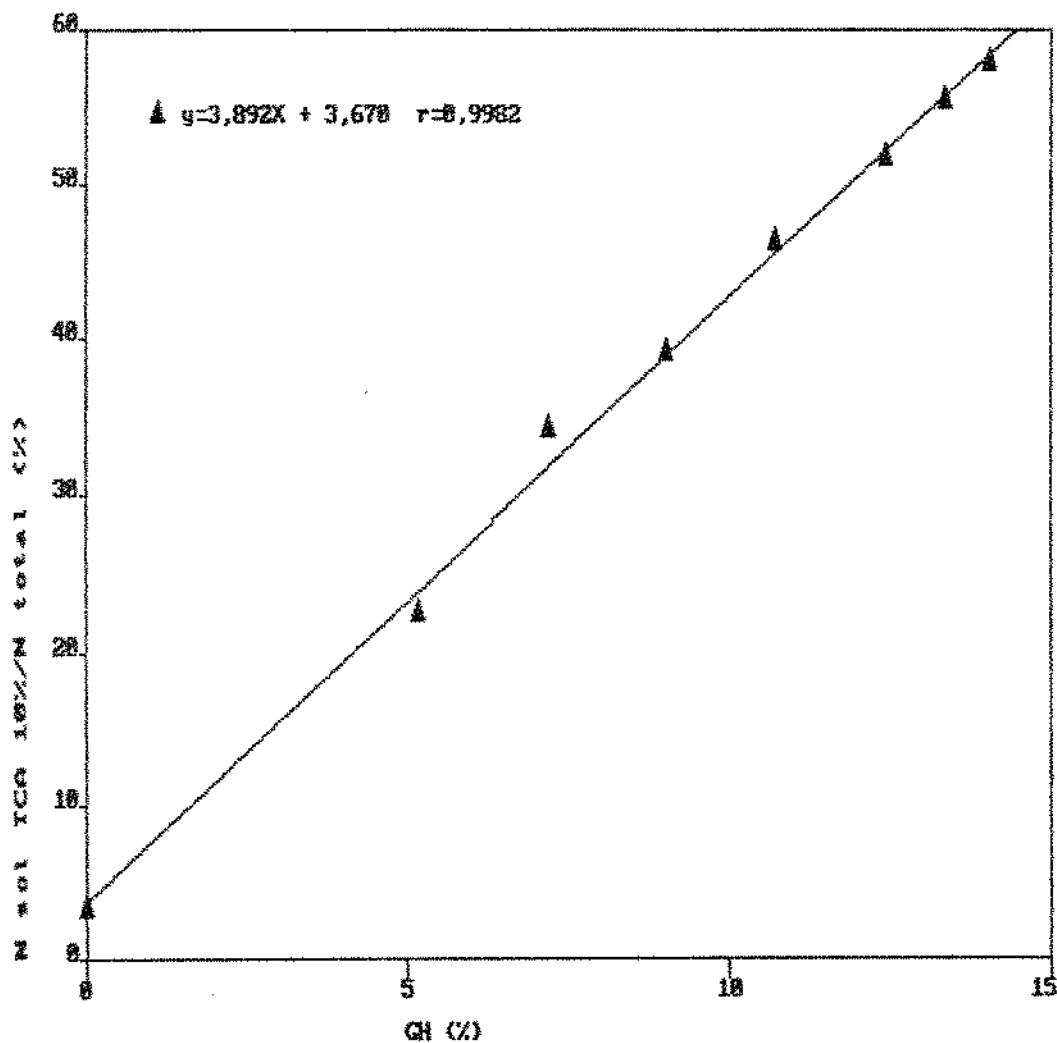


Figura 3. Correlação entre grau de hidrólise (GH) e N solúvel em TCA 10%/N total. Condições de hidrólise: IPS- Sanprosoy 90-NB com pancreatina, [S]= 5,5%, E/S= 1/35, T= 37°C, em água deionizada, pH inicial=7,1, sem controle de pH durante a reação, volume de reação= 250 ml.

chegando à 6,4 após 8 horas de hidrólise (Figura 4). O maior decréscimo de pH, 0,5 de um total de 0,71, se deu até o GH ter atingido o valor de 7,2, cerca de metade do GH no final da hidrólise, sugerindo um aumento da capacidade tamponante do meio (Figuras 3 e 4).

4.1.1.2. Influência da concentração de substrato na curva de hidrólise

As concentrações de substrato utilizadas, 3,5%, 5,5% e 7,5%, mantendo-se constantes as demais condições de hidrólise, não afetaram a velocidade inicial da reação, em relação ao GH. Ao longo da reação houve declínio da velocidade, de forma mais acentuada para as maiores concentrações de substrato, definindo-se um patamar após 6 horas de reação para as concentrações 5,5 e 7,5%. Para as concentrações 3,5% e 5,5%, as curvas de hidrólise não apresentaram grande diferença entre si, ficando a curva obtida para a concentração 7,5% diferente das demais (Figura 5).

O GH alcançado, após 8 horas de reação, com 3,5% de substrato foi de 16,65%, com 5,5% foi de 14,03% e com 7,5%, 10,66%. O GH final da reação com 3,5% de substrato foi 56% superior ao da reação com 7,5% e 19% ao da reação com 5,5% de substrato.

A Figura 5 também mostra o efeito da adição de solução de 1g (E/S=1/55) de enzima após 4 horas de hidrólise, quando se definiu uma diminuição mais acentuada da velocidade de reação. Embora tenha sido observado um comportamento ligeiramente diferente nas três primeiras horas de reação, quando comparada à curva obtida

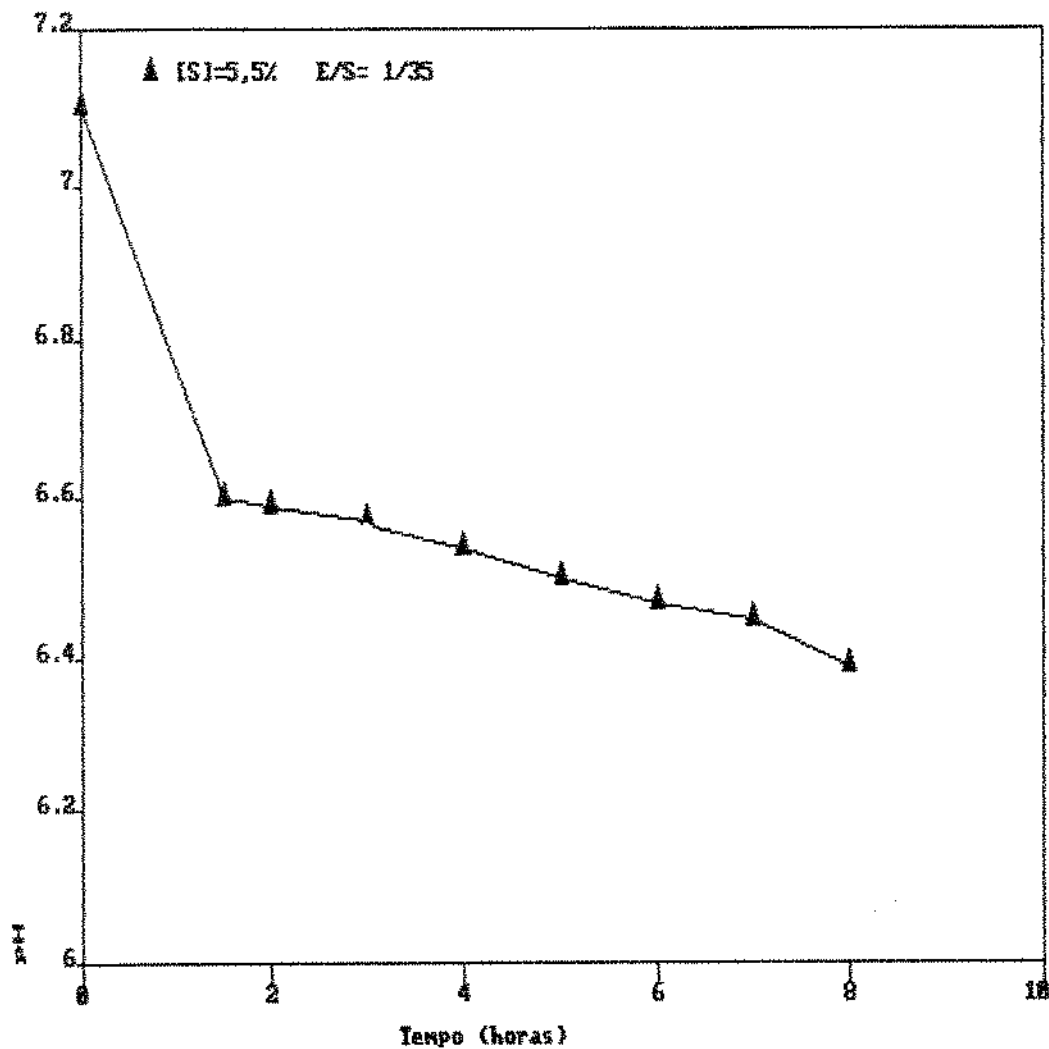


Figura 4. Modificação do pH em uma reação de hidrólise sem controle de pH, em função do tempo. Condições de hidrólise: IPS- Sanprosoy 90-NB com pancreatina, [S]= 5,5%, E/S= 1/35, T= 37°C, em água deionizada, pH inicial=7,1, sem controle de pH durante a reação, volume de reação= 250 ml.

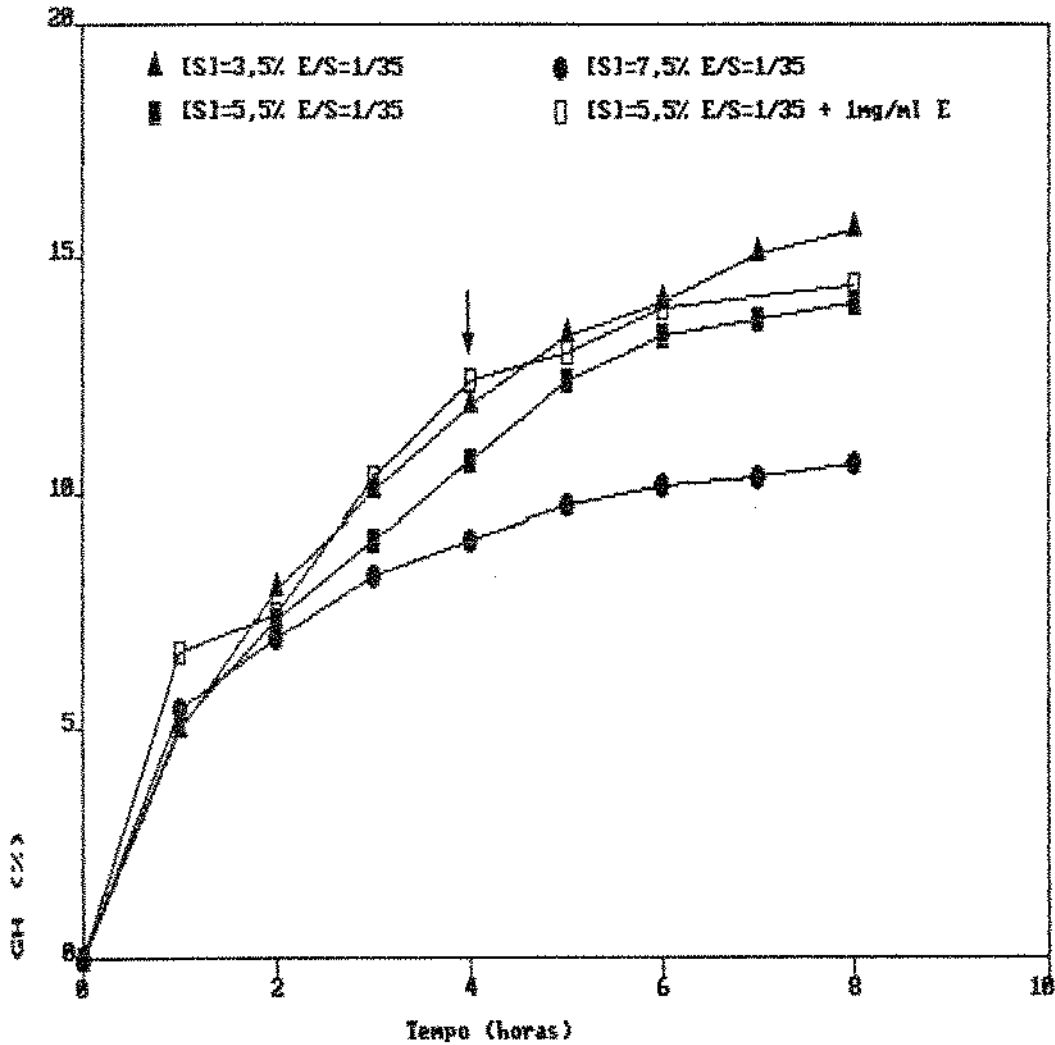


Figura 5. Grau de Hidrólise (GH) em função do tempo com diferentes concentrações de substrato. Condições de hidrólise: IFS- Sanprosoy 90-NB com pancreatina, E/S= 1/35. T= 37°C, em água deionizada, pH inicial= 7,1, sem controle de pH durante a reação. Adição de 1g de pancreatina (E/S= 1/55) após 4 horas (↓).

em condições iguais ($S=5,5\%$ e $E/S=1/35$), a adição da enzima não alterou a velocidade de reação, refletida no formato da curva de hidrólise, indicando que a diminuição da velocidade não foi devido à inativação da enzima.

A modificação do comprimento médio da cadeia peptídica (CMP, em número de resíduos de aminoácidos, sem correção para aminoácidos livres) durante a reação de hidrólise, também foi estabelecida em função da concentração do substrato ($E/S=1/35$) (Figura 6).

Como era esperado, o CMP diminuiu com a proteólise. Esta diminuição ocorreu de forma mais intensa nas quatro primeiras horas de hidrólise e a velocidade decresceu mais rapidamente na maior concentração de substrato. Após 5 horas de hidrólise, a diferença entre o CMP obtido com $3,5\%$ e $5,5\%$ de substrato era praticamente inexistente. Com 8 horas de hidrólise, obteve-se peptídios com 7 e 6 resíduos de aminoácidos para concentração de substrato $3,5\%$ e $5,5\%$ respectivamente. Para a hidrólise com $7,5\%$, o CMP após 8 horas de reação foi de 9 resíduos de aminoácidos.

4.1.1.3. Efeito da concentração de enzima

O efeito da concentração da pancreatina na proteólise do IPS, em relação ao aumento de nitrogênio solúvel em TCA 10% está demonstrado na Figura 7. Após 8 horas de reação, para a concentração de substrato $5,5\%$ e relação E/S de $1/70$, observou-se $25,6\%$ de N solúvel em TCA 10% enquanto que para a mesma concentração de substrato e relação E/S de $1/35$ o N solúvel em TCA 10% foi

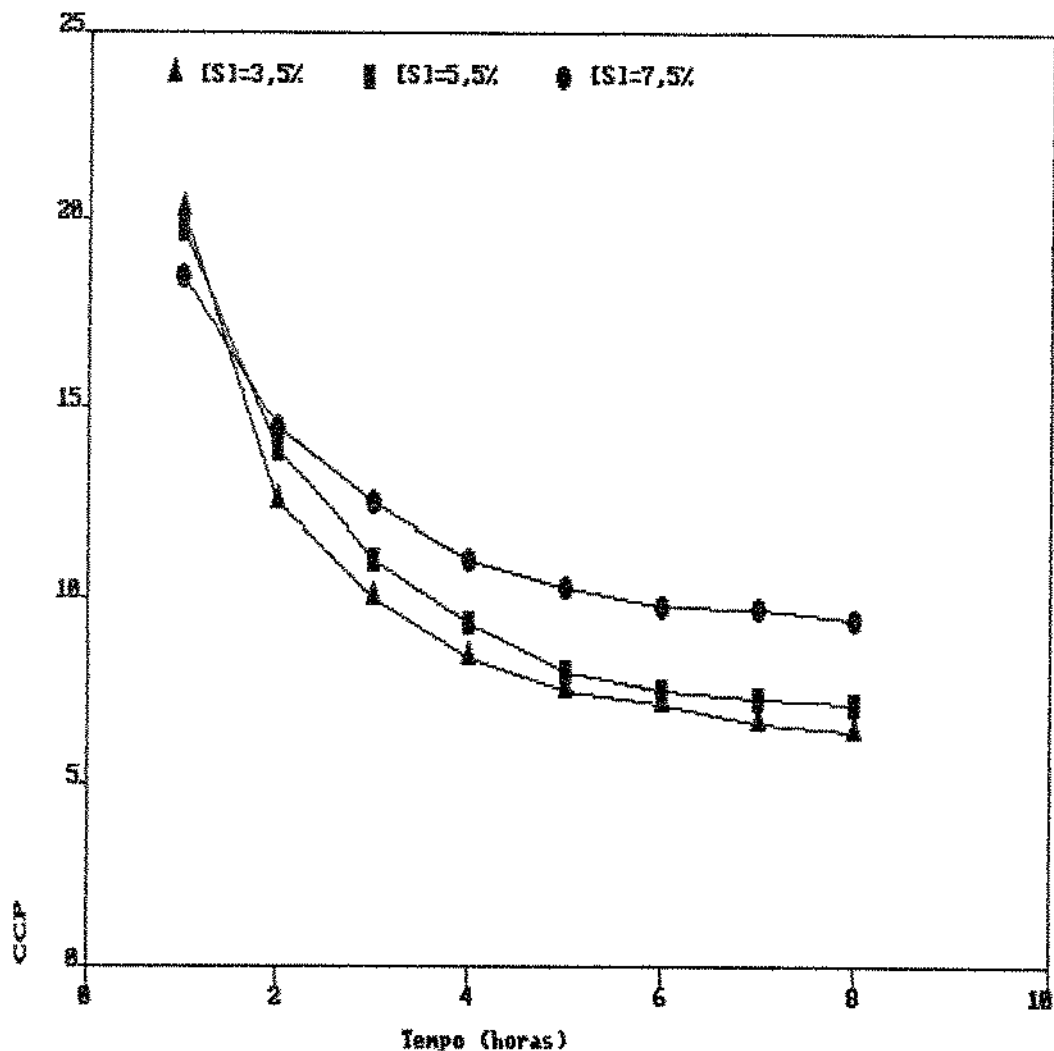


Figura 6. Comprimento médio da cadeia peptídica (CMP—sem. correção para aminoácidos livres) em função do tempo, com diferentes concentrações de substrato. Condições de hidrólise: IPS— Sanprosoy 90—NB com pancreatina, E/S= 1/35, T=37°C, em água deionizada, pH inicial=7,1, sem controle de pH durante a reação).

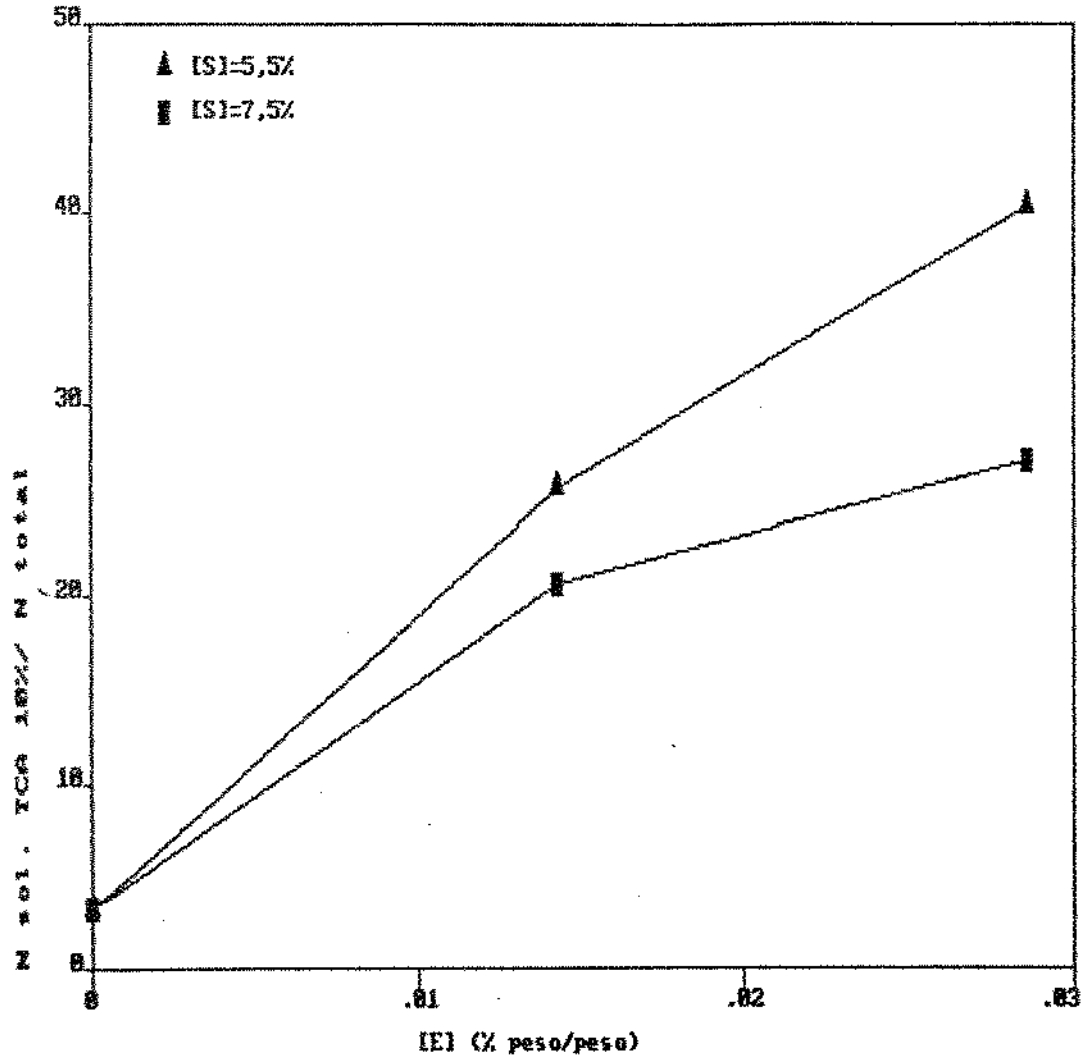


Figura 7. Efeito da concentração de enzima na hidrólise do isolado protéico de soja com pancreatina. Condições de hidrólise: IPS- Sanprosoy 90-NB com pancreatina, T= 37°C, em água deionizada, pH inicial= 7,1, sem controle de pH durante a reação.

de 40,2%. Para 7,5% de concentração de substrato e relação E/S de 1/70, obteve-se 20,6% e para relação E/S de 1/70, 27,1% de N solúvel em TCA 10%.

O aumento da concentração da enzima em relação ao substrato refletiu em maior hidrólise, para as diferentes concentrações de substrato utilizadas, no entanto, este aumento não foi proporcional ao aumento da concentração de enzima.

4.1.2 Obtenção do hidrolisado

Embora o estudo do efeito dos parâmetros de hidrólise, concentração de substrato e relação E/S, indiquem as melhores condições, dentro dos limites estudados, para a obtenção de hidrolisado, alguns pontos mais devem ser considerados. Entre eles estão aspectos como o rendimento da produção de hidrolisados de baixo peso molecular, questão central do presente trabalho, aspectos que contemplam a produção industrial em sistema descontínuos, que devem favorecer a utilização de alta concentração de substrato e baixa concentração de enzima (Adler-Nissen, 1985), bem como a eficiência da separação das frações hidrolisadas e não hidrolisadas.

Decidiu-se, então, verificar o efeito da concentração do substrato, utilizando as concentrações já estudadas anteriormente, 3,5% e 5,5%, na obtenção dos hidrolisados, de acordo com o procedimento apresentado na Figura 1. Para tanto, foram determinados N presente no sobrenadante após a centrifugação, N solúvel, N solúvel em TCA 10%/N total, N solúvel em TCA 10%/N solúvel, para diferentes condições de hidrólise (Tabela 3). Os resultados mostra-

Tabela 3. Relação entre N solúvel e N total, N solúvel em TCA 10% e N total e N solúvel em TCA 10% e N solúvel obtidas após hidrólise de isolado protéico de soja com pancreatina utilizando condições de hidrólise diversas.¹

Condições de Hidrólise ²		N solúvel ³ / N total (%)	N sol. em TCA10%/ N total (%)	N sol. em TCA10%/ N solúvel ³ (%)
[S]=3,5%	‡ t=6 horas	44,9	29,3	55,5
E/S=1/35	t=8 horas	48,8	36,8	64,4
[S]=3,5%	t=6 horas	53,6	47,6	75,7
E/S=1/18	t=8 horas	55,4	48,2	74,1
[S]=5,5%	t=6 horas	45,7	32,9	61,3
E/S=1/35	t=8 horas	46,8	40,3	73,2
[S]=5,5%	*** t=6 horas	40,5	22,8	48,0
E/S=1/55	*** t=8 horas	42,0	25,6	51,9

¹ isolado protéico de soja - Sanprosoy 90-NB

² T=37°C; em água deionizada, sem controle de pH.

³ N solúvel= N no sobrenadante obtido por centrifugação após a interrupção da reação de hidrólise por tratamento térmico (ver Figura 1)

‡ turbidez leve após a centrifugação

***turbidez forte após centrifugação

ram que, como também havia sido observado anteriormente (item 4.1.2.), menor concentração de substrato aliado à maior relação E/S levaram à obtenção de níveis mais elevados de N solúvel em TCA, que variou entre 22,8 e 48,2% para as condições $S=5,5\%$, $E/S=1/55$ e 6 horas de reação e $S=3,5\%$, $E/S=1/18$ e 8 horas de reação respectivamente. Para estas mesmas condições, a solubilidade de N foi entre 42,0 e 55,4% e a solubilidade do N em TCA 10% em relação ao N solúvel variou entre 40,55 e 75,7% .

No processo de obtenção do hidrolisado, observou-se que o tratamento térmico, realizado para a inativação das enzimas, contribuiu para a separação da proteína hidrolisada da não hidrolisada. O aquecimento favoreceu formação de agregados da proteína não hidrolisada, facilitando a separação por centrifugação. A eficiência da separação das frações solúvel e insolúvel, feita posteriormente, mostrou-se dependente da extensão da proteólise, e consequentemente, das condições de hidrólise. Para aquelas condições em que a proteólise foi mais extensa, apresentando maior porcentagem de N solúvel em TCA 10% em relação ao N presente no sobrenadante (Tabela 3), o sobrenadante se mostrou límpido e de cor amarelada. Para condições onde a proteólise foi menor o sobrenadante se mostrou turvo, com material em suspensão de difícil separação, mesmo em condições mais severas que os 7000g utilizados na centrifugação. A presença deste material em suspensão contribuiu para o aumento do N solúvel bem como para a diminuição da relação N solúvel em TCA 10% em relação ao N solúvel.

Considerando-se que a solubilização da proteína é indicativo do rendimento do processo e que o N solúvel em TCA re-

presenta o rendimento em peptídios de pequeno peso molecular, as melhores condições de hidrólise seriam $[S]=3,5\%$, $E/S=1/18$ e 8 horas de reação. No entanto a opção foi pela utilização de $5,5\%$ de concentração do substrato, E/S de $1/35$ e tempo de 8 horas de reação. Foram considerados os seguintes aspectos para esta escolha: (1) os percentuais de N sol. em TCA /N solúvel obtidos para as duas condições de hidrólise eram praticamente iguais, $74,1$ e $73,2\%$, de forma que a opção pela menor relação E/S era mais interessante sob o ponto de vista econômico (2) apesar do rendimento percentual (N solúvel) ser menor, para a condição de hidrólise escolhida, a massa de hidrolisado obtido por *batch* era maior.

Estas condições foram utilizadas para a obtenção de hidrolisados, de acordo com o procedimento indicado na Figura 1, a partir de três diferentes isolados protéicos de soja, Sanprosoy 90-NB, Proteimax 90-HG e Proteimax 90-HE. Após a separação e liofilização dos hidrolisados obtidos, HI e Ppt, determinou-se o grau de hidrólise e o comprimento das cadeia peptídicas (CMP) de cada um deles (Tabela 4). Dois dos isolados utilizados, Proteimax 90-HG e Sanprosoy 90-NB, apresentaram GH semelhantes para os hidrolisados de baixo PM, $22,0$ e $21,1\%$ respectivamente e, conseqüentemente o CMP semelhantes, $4,8$ e $4,6$ resíduos de aminoácidos. Já, o IPS Proteimax 90-HE apresentou menor grau de hidrólise, $18,9\%$ e maior CMP, $5,3$ resíduos que os demais, indicando maior dificuldade na ação das enzimas proteolíticas sobre este produto.

Os resultados acima indicavam a utilização do Proteimax 90-HE ou Sanprosoy 90-NB para a produção de hidrolisados, com ligeira vantagem para o primeiro. A determinação dos inibidores

Tabela 4. Grau de hidrólise e comprimento médio da cadeia peptídica (CMP) em hidrolisados de baixo PM obtidos pela hidrólise de isolado protéico de soja (Proteimax 90-HE, Proteimax 90-HG e Sanprosoy 90-NB) com pancreatina (condições de hidrólise: em água deionizada, sem controle de pH, T= 37°C, [S]= 5,5%, E/S= 1/35, tempo= 8 horas).

	GH			CMP ¹		
	A	B	C	A	B	C
Sobrenadante (baixo PM)	21,1	22,0	18,9	4,8	4,6	5,3
Precipitado (alto PM)	9,2	9,23	17,4	10,8	9,7	17,4

A Sanprosoy 90-NB
 B Proteimax 90-HG
 C Proteimax 90-HE

¹ CMP = $\frac{100}{GHZ}$ (Adler-Nissen, 1985), em nº de resíduos de aminoácidos

de tripsina presentes, no entanto, determinou a utilização do Sanprosoy 90-NB, que apresentou menor atividade anti-tríptica (ver Tabela 7).

4.2. Caracterização bioquímica do isolado protéico de soja (IPS), do hidrolisado HI (baixo PM) e do hidrolisado Ppt (alto PM)

4.2.1. Composição aminoacídica do IPS e dos hidrolisados HI e Ppt

O IPS utilizado na obtenção dos hidrolisados, Sanprosoy 90-NB, apresentou $91,4 \pm 0,59\%$ de proteína e os hidrolisados HI e Ppt, $86,7 \pm 0,67$ e $84,57 \pm 0,48\%$ respectivamente. A Tabela 5 mostra os resultados da análise de aminoácidos totais (AAT) para o IPS (Sanprosoy 90-NB) e o hidrolisado Ppt (alto PM), e os AAT e aminoácidos livres (AAL) para o hidrolisado HI (baixo PM). O percentual dos aminoácidos dos hidrolisados HI e Ppt em relação ao IPS estão apresentados na Figura 8-a e o percentual dos aminoácidos livres em relação aos totais no hidrolisado HI estão apresentados na Figura 8-b.

A separação realizada no final do processo de hidrólise, de modo a obter-se um sobrenadante, hidrolisado HI, e um precipitado, hidrolisado Ppt, resultou em diferenças na composição entre a matéria-prima e os hidrolisados. Observou-se, na composição em aminoácidos do hidrolisado Ppt, uma redução de 50% do ácido glutâmico, 22% da lisina e 25% de ácido aspártico e um aumento de 17% de metionina. Para o HI foi observada redução de 30% do conteúdo de valina, isoleucina e leucina e 20% de fenilalanina e tirosi-

Tabela 5. Composição aminoácídica do isolado protéico de soja (Sanprosoy 90-NB) e dos hidrolisados Ppt (alto PM) e HI (baixo PM) (gaa/16g N)^{1,2}

	IPS	Ppt	HI (AAT)	HI (AAL)
Ac. Aspártico	13,45±1,32	10,00±1,50	14,08±0,67	0,06±0,00
Treonina	4,14±0,38	3,72±0,56	4,23±0,73	0,30±0,02
Serina	5,70±0,91	4,86±0,71	5,76±0,23	0,51±0,02
Ac. Glutâmico	24,81±1,56	13,27±0,50	27,08±0,42	0,15±0,01
Prolina	5,52±0,01	4,74±0,70	5,19±0,13	----
Glicina	4,40±0,58	3,95±0,24	3,70±0,06	0,02±----
Alanina	4,43±0,09	4,23±0,45	3,72±0,32	0,34±0,02
Cisteína	0,99±0,04	1,01±0,10	0,92±0,08	----
Valina	5,23±0,39	4,22±0,51	3,65±0,15	0,94±0,04
Metionina	1,16±0,15	1,36±0,19	0,97±0,10	0,34±----
Isoleucina	5,82±0,06	4,73±0,44	4,16±0,05	0,92±0,06
Leucina	8,61±0,12	9,44±0,81	6,28±0,60	2,20±0,15
Tirosina	3,78±0,04	3,48±0,03	2,95±0,02	2,03±0,08
Fenilalanina	5,65±0,26	5,38±0,47	4,63±0,01	2,65±0,08
Lisina	6,08±0,51	4,76±0,20	6,21±0,07	0,96±0,05
Histidina	2,49±0,55	2,40±----	2,19±0,19	0,16±0,01
Arginina	7,78±0,55	7,59±0,23	7,26±0,79	1,40±0,08
Triptofano ³	1,28	1,05	1,30	0,72±0,01
AAT	110,82	90,49	104,28	13,70
AAE	39,96	37,06	33,62	9,19
(AAE/ AAT) x 100	36,06	41,09	32,24	67,08
(AAL/AAT) x 100	----	----	----	13,14

¹ valores médios de 3 determinações

² isolado protéico de soja- Sanprosoy 90-NB

³ 1 determinação, exceto para AAL onde o valor é a média de 3 determinações

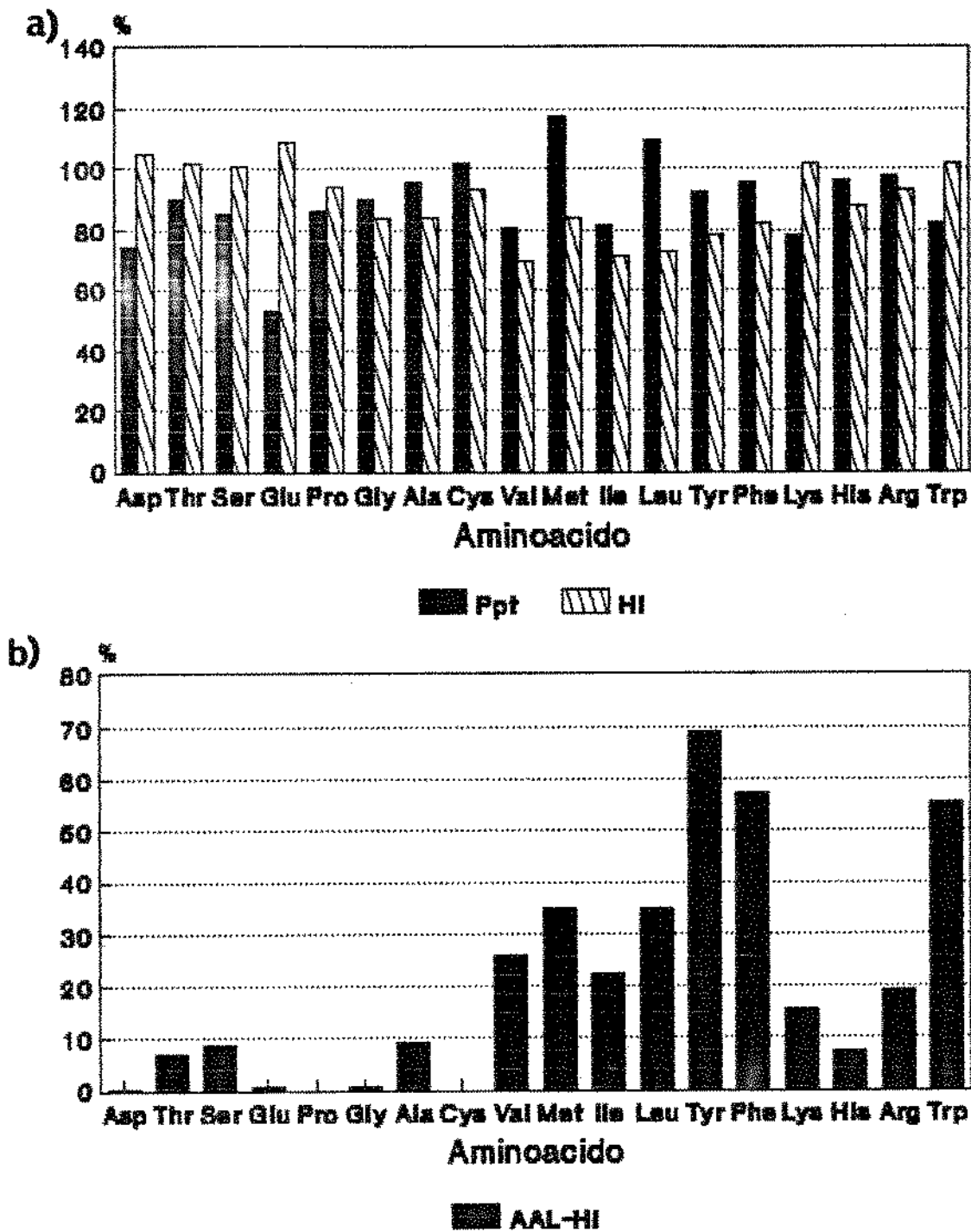


Figura 8. (a) Comparação entre composição aminoacídica do IPS (Sanprosoy 90-NB) e hidrolisados HI e Ppt (%).

(b) Comparação entre aminoácidos totais e livres presentes no hidrolisado HI (%).

na. A relação entre AAE e AAT também foi alterada com fracionamento. O Ppt apresentou uma relação de 41%, enquanto o IPS e HI apresentaram 36 e 32% respectivamente.

O HI apresentou 13,14% de aminoácidos livres, representados principalmente pela fenilalanina, tirosina, leucina, lisina e triptofano. Aproximadamente 57% da fenilalanina, 69% da tirosina, 55% do triptofano e 35% da leucina estão na forma de AAL. Os AAL essenciais representaram 67% dos aminoácidos livres totais. Embora o aminograma indicasse a presença de outros aminoácidos como a asparagina, glutamina e ácido cistéico, não foi possível uma identificação precisa e quantificação destes aminoácidos.

4.2.2. Análise de minerais do IPS e dos hidrolisados HI e Ppt

O conteúdo de cinzas do hidrolisado HI foi 6,18%, foi 59% superior o do hidrolisado Ppt, 3,88% e 26% superior aos do IPS, 4,55%. Estes resultados devem-se ao fato do hidrolisado HI ser a fração solúvel, onde estão a maior parte dos eletrólitos. A Tabela 6 mostra que os minerais presentes em maior concentração, em todas as amostras foram o P, Na e K. O fósforo se encontrava em parte na forma de fitato, perfazendo 92% do P existente na fração HI, 36,5% no IPS e 25,3% no Ppt.

Tabela 6. Análise de minerais do isolado protéico de soja (Sanprosoy 90-NB) e nos hidrolisados HI e Ppt (mg/g amostra)

	IPS	HI	Ppt
Na	10,67	13,45	6,15
P	17,63	20,56	11,63
Ca	1,37	1,70	1,14
K	7,74	9,50	4,14
Zn	0,09	0,06	0,12
Mg	1,86	1,86	1,05
Cu	0,04	0,04	0,01
Fe	0,39	0,21	0,58
Se	0,002	0,002	0,002
Mn	0,06	0,06	0,04
Cr	0,0004	0,0004	0,0006

36,5% na forma de fitato.

91,2% na forma de fitato.

25,3% na forma de fitato.

4.2.3. Presença de fatores anti-nutricionais no IPS e nos hidrolisados HI e Ppt

A atividade dos inibidores de tripsina para os três tipos de IPS utilizados neste trabalho, Proteimax 90-HE, Proteimax 90-HG e Sanprosoy 90-NB, e os respectivos hidrolisados estão na Tabela 7. O fitato (como ácido fítico), determinado apenas para Sanprosoy 90-NB, também está reportado na Tabela 7.

A atividade dos inibidores de tripsina observada para os IPS foi bastante diversa com valores de 72 a 211 UTI/mg de proteína. A atividade residual, após a hidrólise com pancreatina, foi maior para a fração solúvel, hidrolisado HI, do que para a fração insolúvel, hidrolisado Ppt, para todos os isolados utilizados. A redução da atividade foi maior quando utilizado o IPS que apresentou menor atividade (Sanprosoy 90-NB) tanto em termos absolutos quanto percentuais: houve redução de 83% para o HI e de 98% para o Ppt. Para os outros IPS a atividade anti-triptica residual foi 16,8 e 53,4% para o HI e 36,4 e 16,3% para o Ppt (Proteimax 90-HG e Proteimax 90-HE respectivamente).

Em relação ao fitato (Tabela 7), observou-se maior concentração no hidrolisado HI (fração solúvel), 30,74 mg/g proteína, valor 2,6 vezes maior do que para o IPS, 11,7 mg fitato/g de proteína. No hidrolisado Ppt (fração insolúvel), foi observado 4,95 mg de fitato/g de proteína, 42% do observado para o IPS.

Tabela 7. Inibidores de tripsina (IT) determinados em três tipos de isolado protéico de soja (Sanprosoy 90-NB, Proteimax 90-HG e Proteimax 90-HE) e nos hidrolisados HI (baixo PM) e Ppt (alto PM) obtidos a partir destes isolados e ácido fítico para o IPS Sanprosoy 90-NB e hidrolisados HI e Ppt.

	A			B			C		
	IPS	Ppt	HI	IPS	Ppt	HI	IPS	Ppt	HI
UTI/mg prot	72,17	1,18	12,14	211,39	77,01	102,10	114,66	18,74	61,15
Ac. Fítico (mg/g prot.)	11,65	4,95	30,74	nd	nd	nd	nd	nd	nd

A - Sanprosoy 90 - NB

B - Proteimax 90 - HG

C - Proteimax 90 - HE

nd- não determinado

4.3. Determinação do perfil de peso molecular do hidrolisado proteico

4.3.1. Cromatografia em Gel

A Figura 9 mostra o cromatograma de 44 mg de amostra (hidrolisado HI), em gel de Sephadex G-25. A padronização da coluna foi feita com albumina e os aminoácidos tirosina e triptofano. O efluente da coluna foi analisado por absorvância à 280 nm e à 570 nm após reação com ninidrina (sem e com hidrólise alcalina prévia).

Com relação à absorvância à 280 nm, a amostra cromatografada apresentou um pico na região de exclusão molecular, outro caracterizado na região de eluição do aminoácido aromático tirosina e ainda outro pico bem caracterizado na região do triptofano. Entre o pico de exclusão e o da tirosina, o material eluído não apresentou picos característicos. O perfil obtido pela reação do material eluído com ninidrina (sem hidrólise alcalina), apresentou apenas um pico característico na região anterior aos aminoácidos aromáticos. A curva obtida pela reação da ninidrina com o material eluído após sofrer hidrólise alcalina, mostrou um pico na região do volume de exclusão, que ultrapassou a capacidade de leitura do espectrofotômetro, um pico na região anterior aos aminoácidos aromáticos e outros dois picos na região dos aminoácidos aromáticos. A comparação qualitativa dos dois perfis obtidos pela reação com ninidrina, mostrou que tornam-se quase coincidentes a partir dos 200 ml de volume de eluição, indicando a presença apenas de aminoácidos livres, já que a hidrólise alcalina não resultou em aumento de gru-

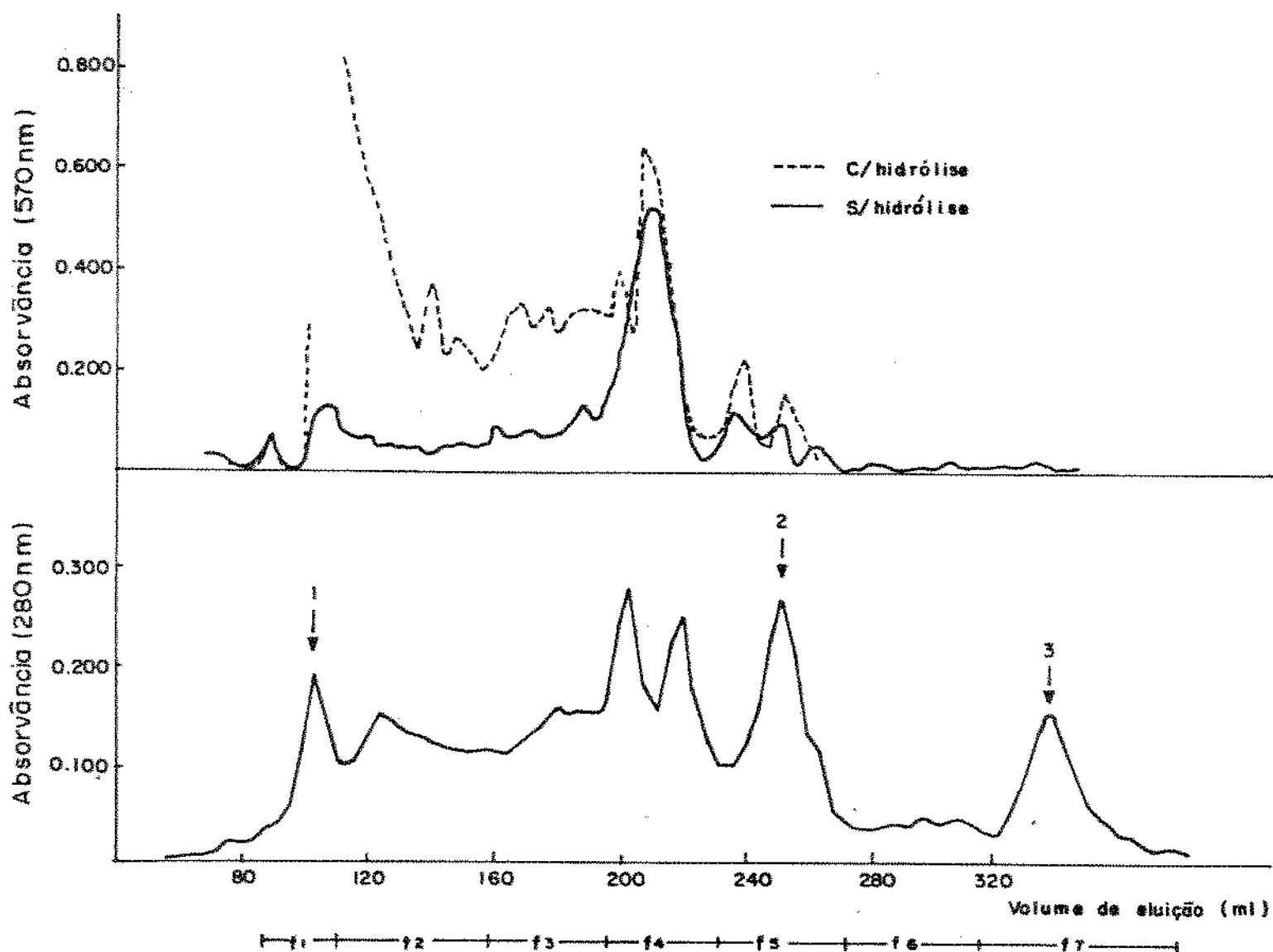


Figura 9. Cromatografia do hidrolisado HI em gel de Sephadex G-25, eluido com ácido acético 5%. Figura superior: medida de absorvância à 570 nm após reação do eluato com ninidrina, com e sem hidrólise alcalina prévia. Figura inferior: medida de absorvância à 280 nm; os números indicam a posição de eluição dos seguintes padrões: (1) albumina bovina, (2) tirosina (3) triptofano; f1 a f6 indicam a divisão em frações de acordo com as características de eluição.

pos amino livres. Já, a grande diferença observada na região de exclusão molecular sugere a presença de peptídios de cadeias grandes. Esta diferença diminuiu com o volume de eluição, indicando a presença de peptídios de cadeias menores.

Com base nos perfis obtidos, o material eluído foi separado em frações de peso molecular ou característica de eluição o mais semelhante possível, como mostra a Figura 9. Desta maneira, e baseando-se nos padrões utilizados, estimou-se que a fração 1, composta pelo material eluído entre 88 e 112 ml, volume correspondente à eluição da albumina, era constituída por peptídios com peso molecular igual ou maior que 5000 daltons, faixa de exclusão molecular do Sephadex G-25 (Determann, 1969). A fração 2, composta pelo material eluído entre 112 e 160 ml, e a fração 3, entre 160 e 196 ml, continham peptídios com peso molecular menor que 5000 daltons; a fração 4, entre 196 e 232 ml, e fração 5, entre 232 e 272 ml, pequenos peptídios e aminoácidos livres e que correspondiam à eluição da fenilalanina e tirosina respectivamente. A fração 6, de 272 a 316 ml, e a fração 7, entre 316 e 376 ml, eram constituídas quase exclusivamente por aminoácidos livres. Em coluna de Sephadex G-25 desenvolvida de maneira semelhante, Lamounier (1984) obteve para a Bradicinina (PM=1400) o valor de 1,6553 para a relação entre volume de eluição (V_e) e volume de exclusão (V_o). Como esta relação é independente da geometria da coluna (Determann, 1969), e considerando-se este valor para a cromatografia realizada no presente trabalho, a Bradicinina seria eluída em torno de 172 ml, o que corresponderia ao início da fração 3. A partir deste dado poderia-se

considerar que a fração 2 corresponde, então, à peptídios com PM entre 5000 e 1500 daltons e a fração 3 à peptídios com PM inferior à 1500 daltons.

4.3.2. Análise dos aminoácidos livres e totais das frações obtidas por cromatografia em gel

A composição em aminoácidos das frações obtidas por cromatografia em gel de Sephadex (Tabela 8) mostrou que aproximadamente 24% dos aminoácidos totais estão na fração 1, 27% na fração 2, 30% na fração 3, 16,5% na fração 4, 3% na fração 5, 0,4% na fração 6 e 0,35% na fração 7. A relação entre aminoácidos essenciais (AAE) e aminoácidos totais (AAT) foi de 23 a 28% nas três primeiras frações, enquanto que nas frações 4, 5, e 6 esta relação variou entre 40 e 55%, chegando à 100% na fração 7. Tais resultados podem ser creditados à especificidade das enzimas pancreáticas, cuja velocidade para a quebra de ligações pepticas onde participam aminoácidos aromáticos e ramificados é bastante grande.

A distribuição percentual dos aminoácidos nas frações (Tabela 9) mostrou que mais de 70% do ácido glutâmico, aspártico, prolina e lisina apareceram nas frações 1, 2, e 3. Alanina, valina, isoleucina, leucina, tirosina e fenilalanina, que estavam presentes em pequenas percentagens na fração 1, aumentaram nas frações subsequentes. Na fração 4 foi eluído 42% do total da leucina e 28% da fenilalanina. Nas frações 4 e 5 foram eluídos 65 e 63% dos aminoácidos aromáticos tirosina e fenilalanina, respectivamente, enquanto a fração 7 era composta exclusivamente por triptofano.

Tabela 8. Composição em aminoácidos totais (μmol) das frações do hidrolisado HI (44mg de amostra) obtidas por cromatografia de exclusão em gel de Sephadex G-25.

Aminoácido	Fração						
	1	2	3	4	5	6	7
Ac. Aspártico	7,20	11,04	14,55	3,79	0,24	0,08	-
Treonina	1,98	3,11	5,48	1,92	0,09	0,10	-
Serina	3,95	5,17	8,30	2,44	0,15	0,10	-
Ac. Glutâmico	24,84	19,55	18,37	7,31	0,38	0,14	-
Prolina	6,80	5,67	5,85	1,07	-	-	-
Glicina	4,80	5,95	6,57	2,47	0,18	0,09	-
Alanina	1,81	3,08	7,37	3,68	0,13	0,17	-
Cisteína	0,38	0,35	0,24	0,03	-	-	-
Valina	1,52	2,98	4,18	4,74	0,10	0,09	-
Metionina	0,43	0,31	0,49	0,73	0,02	-	-
Isoleucina	2,05	3,15	3,42	3,32	0,18	0,06	-
Leucina	2,06	3,97	4,77	7,95	0,08	0,14	-
Tirosina	0,66	0,39	0,94	0,51	3,21	0,02	-
Fenilalanina	1,07	1,19	2,04	3,27	3,96	0,07	-
Lisina	5,64	5,35	4,44	2,06	0,82	-	-
Histidina	2,18	1,62	1,34	0,69	0,03	-	-
Arginina	5,44	4,71	4,26	4,22	0,05	0,06	-
Triptofano	-	-	-	-	-	-	1,07
Total	72,81	78,30	92,57	50,20	9,62	1,12	1,07
(AAE/AAT)X100	23,2	27,7	28,3	49,6	55,0	40,3	100,0

- não detectado

Tabela 9. Distribuição percentual dos aminoácidos (mol %) presentes nas frações do hidrolisado HI obtidas por cromatografia de exclusão em gel de Sephadex G-25 em relação ao total do mesmo aminoácido.

Aminoácido	Fração						
	1	2	3	4	5	6	7
Ac. Aspártico	19,3	30,0	39,4	10,3	0,7	0,2	-
Treonina	15,6	24,3	43,2	0,7	0,8	-	-
Serina	19,8	25,9	41,6	12,3	0,7	0,5	-
Ac. Glutâmico	35,2	27,7	26,0	10,4	0,5	-	-
Prolina	35,1	29,6	30,2	5,5	-	-	-
Glicina	23,9	29,7	32,8	12,3	0,9	0,5	-
Alanina	11,1	19,0	45,4	22,7	0,8	1,1	-
Cisteína	35,4	33,1	19,3	12,2	-	-	-
Valina	11,1	21,9	30,7	34,8	0,8	0,7	-
Metionina	21,9	15,7	24,6	36,5	1,3	-	-
Isoleucina	16,8	25,9	28,1	27,3	1,4	0,5	-
Leucina	10,8	21,0	25,1	41,9	0,4	0,7	-
Tirosina	11,5	6,7	16,3	8,9	56,4	0,36	-
Fenilalanina	9,3	10,2	17,5	28,3	34,2	0,6	-
Lisina	30,8	29,2	24,3	11,3	4,5	-	-
Histidina	27,7	20,7	17,0	34,3	0,3	-	-
Arginina	29,0	25,1	22,7	22,5	0,3	0,3	-
Triptofano	-	-	-	-	-	-	100,0

- não detectado

A Tabela 10 mostra os aminoácidos livres (AAL) presentes nas frações obtidas pela cromatografia em gel de Sephadex G-25. O início da eluição de aminoácidos livres, ainda que em pequena quantidade, 0,7% do total, se deu na fração 3. Os AAL estavam presentes em maior quantidade na fração 4, representando 78% do total dos AAL recuperados. Os AAL da fração 5, 20% do total, foram compostos principalmente por tirosina e fenilalanina, enquanto que a fração 7 continha apenas triptofano.

A Tabela 11 mostra a distribuição percentual dos AAL em relação ao total do mesmo aminoácido recuperado na fração. Observa-se que o total da cisteína, metionina, isoleucina, leucina e lisina eluídos na fração 4 estavam na forma de AAL. A arginina encontrava-se 84% e a tirosina e fenilalanina 55 e 59% na forma livre. A totalidade dos aminoácidos aromáticos presentes na fração 5 e do triptofano na fração 7 se encontravam na forma livre. Na fração 4, os aminoácidos livres representaram 56% dos aminoácidos presentes, na fração 5, 76% e na fração 7, 100%. Nas frações 3 e 4 estavam presentes 62% da valina sendo que 35% se encontravam na forma livre na fração 4; 70% da leucina e da isoleucina ficaram distribuídas nas frações 3 e 4 e na forma livre na fração 5.

O resultado de 233% de cisteína na fração 4 (Tabela 11), deve-se, possivelmente, à problemas ligados à quantificação de aminoácidos sulfurados utilizando a hidrólise ácida sem oxidação prévia com ácido perbórico. Deve-se ainda destacar que a análise de aminoácidos livres está sujeita à interferência de peptídios que podem ter volume de eluição semelhante ao dos aminoácidos.

Tabela 10. Composição em aminoácidos livres (μmol) das frações do hidrolisado HI (44 mg de amostra) obtidas por cromatografia de exclusão em gel de Sephadex G-25.

Aminoácido	Fração						
	1	2	3	4	5	6	7
Ac. Aspártico	-	-	0,01	0,02	-	-	-
Treonina	-	-	-	0,33	-	-	-
Serina	-	-	-	0,93	-	-	-
Ac. Glutâmico	-	-	0,02	0,58	-	-	-
Prolina	-	-	-	-	-	-	-
Glicina	-	-	0,03	0,28	0,04	0,02	0,01
Alanina	-	-	-	1,65	-	-	-
Cisteína	-	-	-	0,07	-	-	-
Valina	-	-	-	3,12	-	-	-
Metionina	-	-	-	0,70	-	-	-
Isoleucina	-	-	0,02	4,23	-	-	-
Leucina	-	-	-	0,42	-	0,02	-
Tirosina	-	-	-	0,28	3,57	0,02	-
Fenilalanina	-	-	-	1,92	4,07	-	-
Lisina	-	-	0,19	2,13	-	-	-
Histidina	-	-	-	0,42	-	-	-
Arginina	-	-	-	3,55	-	0,05	0,02
Triptofano	-	-	-	-	-	-	1,15
Total	-	-	0,27	20,63	7,68	0,11	1,17
(AAE/AAT)X100	-	-	72,4	74,0	99,4	56,3	99,1

- não detectado

4.3.3. Comprimento médio das cadeias peptídicas (CCP) no hidrolisado de baixo FM, HI

A determinação do comprimento médio da cadeia peptídica foi realizada pela análise das frações obtidas pela cromatografia em gel de Sephadex G-25, em relação ao seu conteúdo de aminoácidos totais, livres e grupos amino-livres. Aminoácidos totais e livres, grupos amino livres bem como o comprimento médio calculado para cada fração estão na Tabela 12.

Os resultados mostraram que a fração 1 continha peptídios com média de 18 resíduos de aminoácidos na cadeia. A fração 2 continha peptídios com 12 resíduos de aminoácidos. A fração 3 apresentou uma queda acentuada no tamanho de peptídios, em média com 5 resíduos, havendo nesta fração uma pequena presença de aminoácidos livres. A fração 4 apresentou peptídios com média de 3 resíduos e cerca de 61% dos grupos amino representados por aminoácidos livres. As frações 5 e 6 apresentaram mais de 95% de aminoácidos livres e uma pequena porção de peptídios com média entre 2 e 3 resíduos de aminoácidos.

Em termos percentuais, o hidrolisado HI apresentou, a partir dos cálculos realizados, cerca de 24% dos peptídios com cadeias contendo em média 18 resíduos de aminoácidos, 26% com média de 12 resíduos, 30% com média de 5 resíduos, 8% com 3 resíduos e 0,03% com 2 resíduos e 13,14% de aminoácidos livres (Tabela 13). Considerando 110 daltons o peso molecular médio dos aminoácidos, o hidrolisado, em relação ao peso molecular, apresentou 24% de peptídios com aproximadamente 2000 daltons, 26% com 1300 daltons, 30%

Tabela 12. Distribuição molar dos aminoácidos totais e aminoácidos livres e comprimento médio das cadeias peptídicas (CCP) nas frações obtidas por cromatografia do hidrolisado HI.

	Fração						
	1	2	3	4	5	6	7
umoles AAT na fração	72,81	78,30	92,57	50,20	9,62	1,12	1,07
umoles AAL na fração	-	-	0,09	28,64	7,68	0,09	1,12
umoles de -NH ₂ na fração	4,05	6,6	19,07	47,00	8,20	0,51	1,31
comprimento médio da cadeia peptídica ¹	18	12	5	3	3	2	1

¹expresso como número médio de resíduos na cadeia peptídica = $\frac{\text{umol AAT} - \text{umol AAL}}{\text{umol de -NH}_2 - \text{umol AAL}}$ na fração (Chen et alii, 1962).

Tabela 13. Caracterização do hidrolisado HI em relação ao comprimento médio das cadeias peptídicas.

Característica do Material	Percentual em relação ao conteúdo total
Peptídeos com média de 18 resíduos na cadeia	23,2
Peptídeos com média de 12 resíduos na cadeia	25,6
Peptídeos com média de 5 resíduos na cadeia	30,3
Peptídeos com média de 3 resíduos na cadeia	7,1
Peptídeos com média de 2 resíduos na cadeia	0,03
Aminoácidos livres	13,14

com 550 daltons, 8% com cerca de 330 daltons e 13% na forma de aminoácidos livres.

4.4. Caracterização Nutricional

4.4.1. Cômputo químico

A Tabela 14 mostra a composição em aminoácidos essenciais da caseína, IPS (Sanprosoy 90 NB), hidrolisados HI e Ppt e os valores de uma proteína padrão sugeridos pelo NRC (1980). A caseína não apresentou nenhuma deficiência de aminoácidos quando comparada ao padrão do NRC. As proteínas de soja, em sua forma integral e hidrolisada, apresentaram deficiência em aminoácidos sulfurados, o HI atingiu 73% do padrão, o Ppt 92% e o IPS 80%. Para o hidrolisado HI, além dos sulfurados, a valina e a leucina estavam abaixo do padrão, com valores alcançando 77 e 90%, respectivamente. Para todas as proteínas, os outros aminoácidos, alcançaram ou ultrapassaram as concentrações do padrão da NRC.

4.4.2. Resultados do Ensaio Biológico I

Os valores médios e desvios padrão do ganho de peso, consumo de proteína e FER encontrados para caseína (CAS), isolado protéico de soja (IPS) e para os hidrolisados enzimáticos de proteína de soja, HI, HNS e Ppt estão apresentados na Tabela 15.

As dietas contendo proteína de soja na forma integral ou hidrolisada obtiveram valores de FER menores ($P < 0,05$) da-

Tabela 14. Comparação entre a composição em aminoácidos (mg aa/g proteína) da caseína, isolado protéico de soja (Sanprosoy 90-NB) e hidrolisados HI e Ppt, utilizados na preparação da dieta e da proteína padrão segundo a National Research Council (1980).

	Padrão	CAS	IPS	HI	Ppt
Histidina	1,7	2,4	2,5	2,2	2,4
Isoleucina	4,2	4,9	5,3	4,2	4,7
Leucina	7,0	8,9	8,6	6,3	9,4
Lisina	5,1	6,7	6,1	6,2	4,8
Sulfurados Totais	2,6	---	2,1	1,9	2,4
Aromáticos Totais	7,3	10,0	9,4	7,6	8,9
Treonina	3,5	4,7	4,4	4,2	3,7
Triptofano	1,1	1,3	1,2	1,3	1,1
Valina	4,8	5,4	5,2	3,7	4,2

Tabela 15. Ganho de peso, consumo de proteína e coeficiente de utilização proteica (PER) para o Ensaio Biológico I^{1, 2}.

	Dieta				
	CAS	IPS	HNS	HI	Ppt
Peso inicial (g)	44,67±8,67	43,50±8,60	44,33±7,70	41,00±5,57	45,83±9,12b
Ganho de peso (g/dia)	4,16±0,41	2,40±0,25	2,41±0,18	2,07±0,20	2,85±0,55
Consumo de proteína (g/dia)	1,52±0,09	1,27±0,11 ^a	1,36±0,10 ^a	1,17±0,08 ^a	1,40±0,22 ^a
PER	2,78±0,13 ^c	1,80±0,10 ^{ab}	1,89±0,1 ^b	1,77±0,2 ^a	2,09±0,2 ^{bc}
PER (corrigido)	2,5	1,62	1,70	1,59	1,87

1 Média ± desvio padrão de 6 animais.

2 Letras iguais na mesma linha, não há diferença significativa (P>0,05).

quele obtido pela dieta CAS, com exceção do Ppt que não apresentou diferença ($P > 0,05$). O PER do IPS não diferiu de nenhum dos hidrolisados ao nível de 5%, embora estes tenham apresentado diferenças entre si, sendo que o hidrolisado HI apresentou resultados significativamente inferiores ($P < 0,05$) aos demais. A Figura 10 mostra a variação de peso em relação ao tempo e ilustram os resultados obtidos: a superioridade da dieta CAS sobre as demais dietas e a pequena diferença entre as dietas com proteínas de soja durante todo o experimento. É interessante notar que o consumo das dietas com proteína de soja não apresentaram diferença, com exceção da dieta HI, o que sugere que a presença do gosto amargo presente nos hidrolisados protéicos, não afetou o padrão de consumo.

Os resultados mostraram alta digestibilidade para todas as dietas, com valores entre 92,2 e 94,2, não havendo diferença significativa entre elas ($P > 0,05$) (Tabela 16). O Balanço Nitrogenado (BN), Valor Biológico aparente (VBA) e Utilização Líquida de Proteína (NPU) (Tabela 16) não apresentaram diferenças significativas para as dietas CAS, IPS, HNS e Ppt. Já a dieta HI apresentou resultados inferiores em cerca de 8% ao obtido pelas outras dietas. Estes baixos índices deveram-se principalmente à alta excreção de nitrogênio urinário observada, embora a perda de nitrogênio fecal tenha sido menor para a dieta HI do que para as outras dietas.

O exame macroscópico das vísceras não revelou nenhuma alteração sob quaisquer das dietas experimentais.

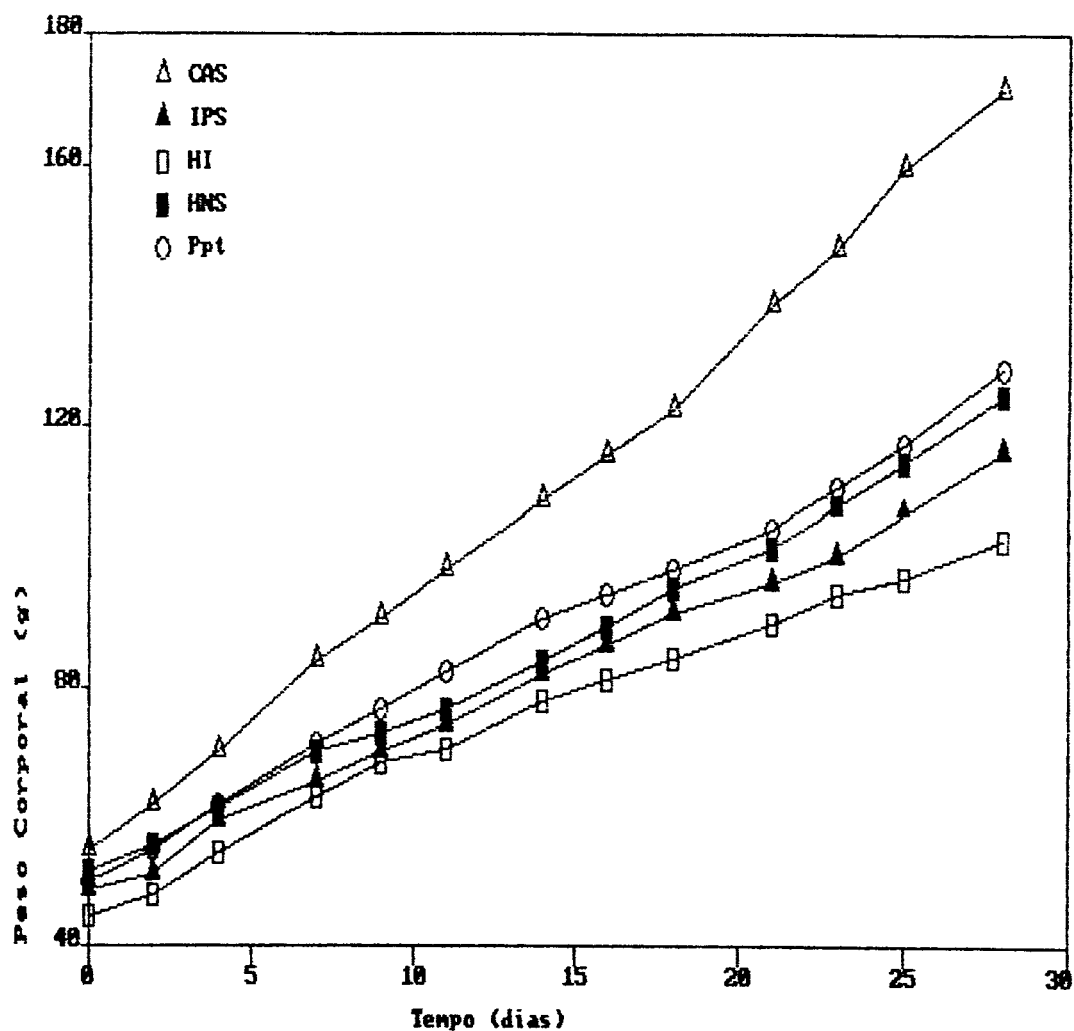


Figura 10. Ensaio Biológico I: Variação do peso médio de ratos Wistar em relação ao tempo em dietas de (1) caseína (CAS), (2) isolado protéico de soja (IPS), (3) hidrolisado HI (baixo PM), (4) hidrolisado enzimático de IPS contendo as frações insolúvel e solúvel (HNS), (5) hidrolisado Ppt (alto PM).

Tabela 16. Balanço Nitrogenado (BN), Digestibilidade aparente (Da), Valor Biológico aparente (VBa) e Utilização Líquida de Proteína (NPU) para o Ensaio Biológico I^{1, 2}.

	Dieta				
	CAS	IPS	HNS	HI	Ppt
N ingerido (mg)	3025±156	2725±270	2742±183	2556±214	2680±885
N urinário (mg)	342±97	330±140	350±79	493±165	279±82
N fecal (mg)	181±10	192±56	204±71	151±25	172±31
BN (mg)	2502±114	2206±127 ^{ab}	2159±237 ^c	1912±135 ^{acd}	2218±176 ^{bd}
Da (%)	94,0 ±0,2 ^a	93,1 ±1,1 ^a	93,8 ±1,3 ^a	94,0 ±1,0 ^a	93,0 ±1,4 ^a
VBa (%)	86,65±2,49 ^b	87,22±4,55 ^b	86,34±3,40 ^{ab}	79,34±5,69 ^a	88,98±2,52 ^b
NPU	81,47±2,25 ^b	81,27±4,96 ^b	81,01±3,61 ^{ab}	75,01±5,47 ^a	82,96±3,03 ^b

¹ Média ± desvio padrão de 5 animais.

² Letras iguais na mesma linha, não há diferença significativa (P>0,05).

4.3.3. Resultados do Ensaio Biológico II

Neste experimento animais recém-desmamados, após 5 dias em dieta de caseína, permaneceram sob dieta aprotéica por 15 dias, o que resultou na perda de, em média, 22% de peso corporal e um quadro de déficit protéico. Findo este período, os animais receberam dietas com diferentes fontes protéicas, CAS, IPS, HI e HI+Met. Os resultados para ganho de peso, consumo de proteína e PER para o período de repleção estão na Tabela 17. A dieta CAS promoveu o maior crescimento dos animais depletados, com ganho ponderal de 4,47 g/dia enquanto que para as dietas à base de proteína de soja estes valores ficaram em torno de 2,43 e 3,64 g/dia. O PER, calculado para o período de repleção protéica, mostrou resultados superiores para a dieta CAS, como também observado no Ensaio Biológico I. A suplementação do hidrolisado HI com metionina (HI+Met) fez com que houvesse aumento significativo da eficiência protéica, ultrapassando o valor obtido para IPS. O consumo das dietas CAS e IPS não apresentaram diferença significativa e foi superior às dietas com hidrolisado, HI e HI+Met. No Ensaio Biológico I, a dieta contendo o hidrolisado de baixo FM (HI), também foi consumida em menor quantidade.

O crescimento dos animais não foi uniforme ao longo do período de recuperação. Observou-se, nos dois primeiros dias de recuperação crescimento semelhante para todas as dietas, verificando-se posteriormente diferença significativa no crescimento (Figura 11).

Tabela 17. Ganho de peso, consumo de proteína e coeficiente de utilização proteica (PER) para o Ensaio Biológico II^{1, 2}.

	Dieta			
	CAS	IPS	HI	HI + Met
Peso inicial (g) ³	62,67±7,03	61,00±5,05	61,08±5,65	60,33±7,39
Ganho de peso (g/dia)	4,47±0,48	3,64±0,46	2,43±0,43	3,30±0,78
Consumo de proteína (g/dia)	1,22±0,12 ^a	1,36±0,10 ^a	1,04±0,10 ^b	1,09±0,12 ^b
PER	3,80±0,23 ^c	2,67±0,10 ^{ab}	2,33±0,26	3,00±0,45 ^b
PER (corrigido)	2,5	1,76	1,53	1,97

¹média ± desvio padrão de 6 animais.

²letras iguais na mesma linha, não há diferença significativa (P>0,05).

³peso após 15 dias de dieta aprroteica.

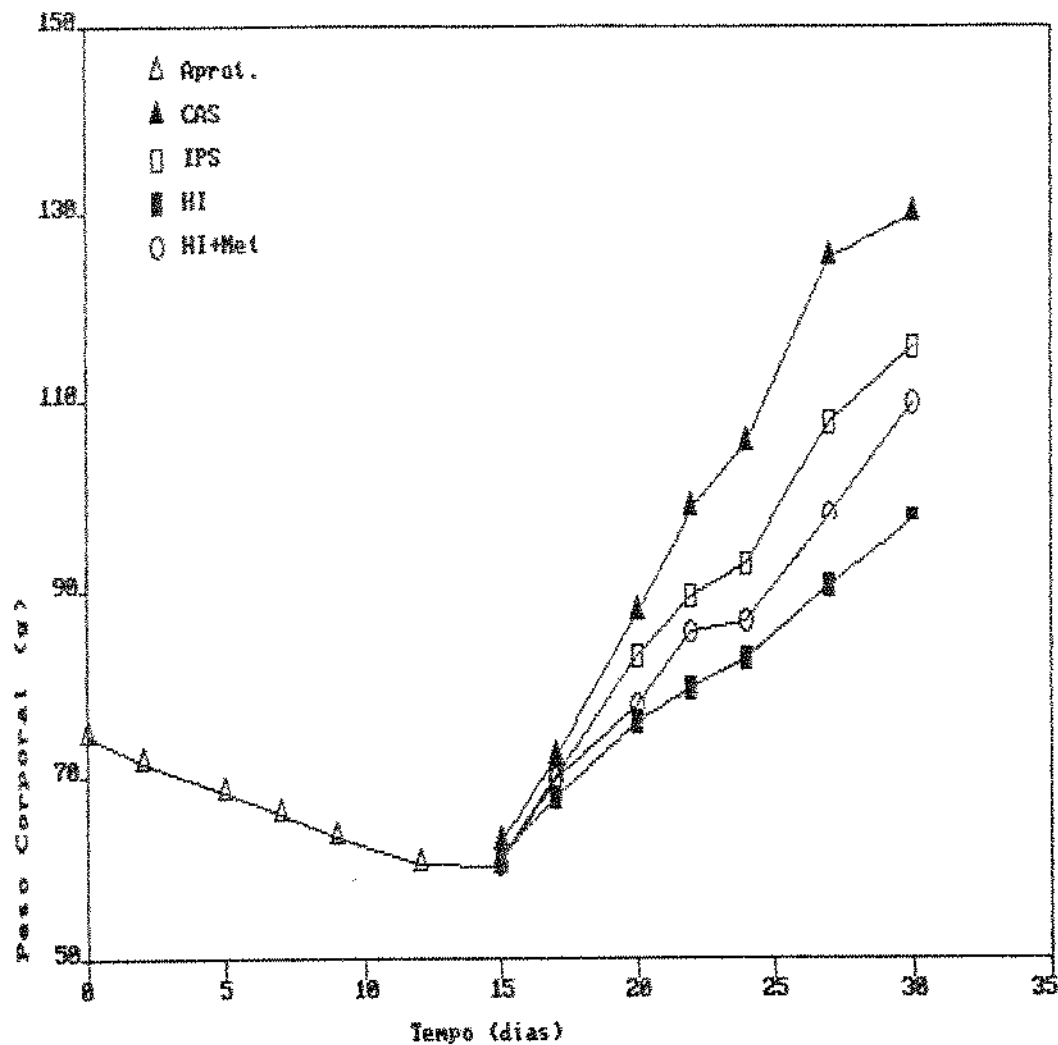


Figura 11. Ensaio Biológico II: Variação do peso médio de ratos Wistar em relação ao tempo, submetidos à dieta aprotéica por 15 dias e recuperados com dietas de (1) caseína (CAS), (2) isolado protéico de soja (IPS), (3) hidrolisado de IPS HI (baixo PM) e (4) o mesmo hidrolisado suplementado com 0,1% de metionina (HI+Met).

Os valores para Balanço Nitrogenado (BN), Digestibilidade aparente (D_a), Valor Biológico aparente (VBa) e Utilização Líquida de Proteína (NPU) (Tabela 18) mostram que a D_a de todas as dietas foi bastante elevada, apresentando maior valor para dieta HI+Met, porém sem apresentar diferença ($P>0,05$) entre esta e as outras dietas à base de proteína de soja, HI e IPS. A dieta de caseína apresentou menor digestibilidade, seja em animais em recuperação proteica seja em animais normais. Os índices de qualidade protéica incluindo valores de BN, BV e NPU (Tabela 18) foram menores para a dieta HI. A suplementação do hidrolisado HI com metionina, dieta HI+Met, resultou na elevação das médias obtidas pelo HI embora não significativa ($P>0,05$). As perdas de nitrogênio urinário em relação ao nitrogênio ingerido foram cerca de 6% maiores para as dietas contendo hidrolisados do que o observado para dietas com proteína integral.

O estudo histomorfométrico (Tabela 19), mostrou que a altura das vilosidades do íleo após 15 dias de dieta aprotéica estavam 27% menores do que a o apresentado por animais alimentados com CAS pelo mesmo período. Aos 15 dias de repleção protéica observou-se plena recuperação da altura das vilosidades não mais havendo diferenças ($P>0,05$) entre as dietas experimentais. Os ratos que permaneceram em dietas aprotéicas por 30 dias tiveram redução ainda maior das vilosidades, mostrando o agravamento de seu estado nutricional.

A Figura 12, Foto 1, mostra criptas e vilosidades normais do íleo de um rato, em dieta CAS, que não passou por dieta aprotéica. A Foto 2, evidencia a altura reduzida das vilosidades

Tabela 18. Balanço Nitrogenado (BN), Digestibilidade aparente (Da), Valor Biológico (VBa), Utilização Líquida de Proteína (NPU) para o Ensaio Biológico II^{1, 2}

	Dieta					
	CAS ³ (28)	CAS	IPS	HI	HI + Met	Aprot.
N ingerido (mg)	1491±123	1285±155	1380±188	1044±110	956±193	----
N urinário (mg/l)	302±43	180±42	207±68	232±35	200±42	28±5
N fecal (mg)	130±21	107±19	99±28	73±9	62±9	26±9
BN (mg)	1059±175	998±103	1025±187	699±121 ^a	693±149 ^a	----
Da	91,3±0,7 ^a	91,7±0,9 ^{ab}	92,9±1,7 ^{bcd}	92,8±0,4 ^{bc}	93,6±0,7 ^{cd}	----
VBa	77,74±2,63 ^{abc}	84,88±1,95 ^d	83,73±5,55 ^{cd}	74,78±5,32 ^a	77,61±2,84 ^{ab}	----
NPU	70,88±2,92 ^{ab}	77,81±1,95 ^d	76,46±3,71 ^{cd}	69,28±5,11 ^a	72,61±2,84 ^{abc}	----

¹média ± desvio padrão de 5 animais.

²letras iguais na mesma linha, não há diferença significativa (P>0,05).

Tabela 19. Altura das vilosidades do íleo dos animais do Ensaio Biológico II¹.

Dieta	Altura das Vilosidades (μm)
Aprot. (15 dias)	418 \pm 22
CAS (20 dias) ²	544 \pm 94 ^a
Aprot. (30 dias)	295 \pm 19
CAS	519 \pm 29 ^a
IPS	535 \pm 35 ^a
HI	501 \pm 43 ^a
HI + Met	496 \pm 22 ^a

¹letras iguais não existe diferença significativa.

²animais que não passaram por dieta aprotéica.

de um animal em dieta aprotéica. O epitélio das vilosidades, embora íntegro, apresentou frequente retração do córion. Na foto 3, observou-se o íleo de um animal recuperado da desnutrição com dieta IPS, as criptas e vilosidades apresentam-se normais. A diferença entre os animais alimentados com dieta aprotéica e os animais recuperados com dieta CAS e IPS, evidenciando a normalidade da altura das vilosidades em relação às criptas e o epitélio íntegro, encontrado também em animais alimentados com as outras dietas experimentais. Nas fotos 4, 5 e 6 estão mostrados cortes do jejuno, estômago e duodeno de ratos alimentados com dietas contendo hidrolisado protéico, HI e HI+Met. Na foto 4, criptas e vilosidades estão normais. Neste caso, as vilosidades apresentaram 3 vezes a altura das criptas. Na foto 5, a mucosa estomacal está normal, apresentando as glândulas fúndicas com intensa secreção. A foto 6, mostra o duodeno normal, com as vilosidades longas, características destes animais. Outros órgãos examinados, pâncreas, fígado e rim, não apresentaram qualquer anormalidade.

4.3.4. Resultados do Ensaio Biológico III

Como no ensaio anterior, ratos recém-desmamados, foram submetidos à dieta aprotéica por 15 dias. Após este período um grupo recebeu dieta com caseína suplementada com 0,2% de metionina (2g/16 g N - dieta CAS+Met) e o outro dieta contendo hidrolisado protéico de soja suplementados com os aminoácidos limitantes metionina, leucina e valina (HI+S). Foi adicionado à dieta 0,14% de valina (1,4g/16g N), 0,08% de leucina (0,8g/16g N) e 0,3% de me



tionina (3g/16g N). Com este procedimento os dois grupos receberam quantidades de aminoácidos essenciais de modo a atingir o requerimento da Nutritional Research Council (1980). A composição aminoácídica das dietas, em relação aos aminoácidos essenciais, está apresentada na Tabela 20.

O ganho de peso, consumo de proteína e PER estão na Tabela 21 e Figuras 13 e 14. O consumo foi semelhante para ambas as dietas, fato não observado nos experimentos anteriores onde o consumo das dietas com hidrolisado foi sempre inferior ao consumo das dietas contendo caseína. Embora a média do ganho de peso tenha sido maior para os animais alimentados com CAS+Met, houve 3 fases distintas durante a recuperação (Figura 13). Até o 7º dia o crescimento ponderal dos animais em dieta HI+S foi superior ao dos animais em dieta CAS+Met. Entre o 7º e o 14º dia, o crescimento foi semelhante, e a partir deste período, o crescimento foi superior para a dieta CAS+Met. Sob o ponto de vista da significância estatística, pelo teste t, houve apenas diferença no 4º ($P < 0,05$) e no 5º ($P < 0,10$) dias de recuperação. Os dias 1º, 7º e 10º de recuperação não apresentaram diferença ($P > 0,20$). Após o 10º dia, novamente as diferenças aumentaram sendo maior no 12º dia de recuperação ($P < 0,10$).

Para um mesmo consumo de proteína (Figura 14) o ganho de peso no início da recuperação foi maior com a dieta HI+S do que com a dieta CAS+Met, que correspondem aos sete primeiros dias de recuperação (Figura 13). Posteriormente, o crescimento foi igual para o mesmo consumo, entre o 7º e 9º dia de recuperação. Finalmente, observou-se um período e que o mesmo consumo de proteína resul-

Tabela 20. Composição aminoácídica (aminoácidos essenciais) das dietas utilizadas no Ensaio Biológico III e da proteína padrão, segundo a NRC (1980).

Aminoácido	Dieta		
	CAS + Met.	HI + S	Padrão
Tirosina + fenilalanina	5,62	7,58	7,3
Metionina + cisteína	2,99*	3,28*	2,6
Treonina	5,57	4,23	3,5
Isoleucina	3,53	4,16	4,2
Leucina	7,02	7,04*	7,0
Valina	5,10	5,88*	4,8
Lisina	7,33	5,20	5,1
Triptofano	1,28	1,30	1,1
Histidina	2,19	1,93	1,70

*aminoácidos que foram suplementados: 2g/16g N de metionina para CAS, 3g/16g N de metionina, 1,4g/16g N de valina e 0,6g /16g N de leucina para o HI.

Tabela 21. Ganho de peso, consumo de proteína e coeficiente de utilização proteica (PER) para o Ensaio Biológico III^{1, 2}.

	Dieta	
	CAS + Met.	HI + S
Peso inicial (g) ³	61,53±3,61	63,70
Ganho de peso (g/dia)	5,69±0,65	4,83±0,67
Consumo de proteína (g/dia)	1,46±0,15 ^a	1,44±0,07
PER	3,90±0,14 ^a	3,34±0,38 ^b
PER (corrigido)	2,5	2,14

¹média ± desvio padrão de 5 animais.

²letras iguais na mesma linha, não há diferença significativa (P>0,05).

³peso após 15 dias em dieta aprroteica.

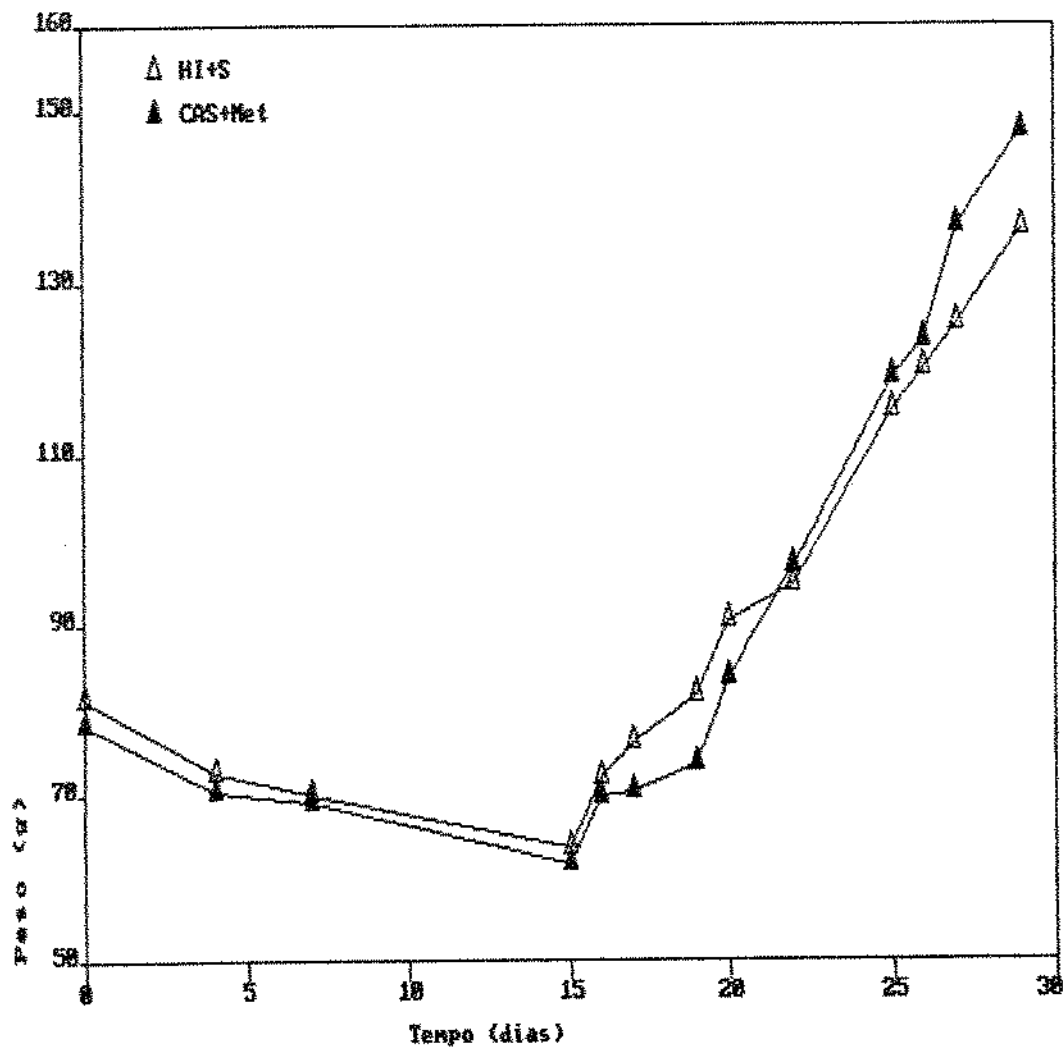


Figura 13. Ensaio Biológico III: Variação de peso médio de ratos Wistar submetidos em relação ao tempo à dieta aprotéica e recuperados com dietas de caseína suplementada com 0,2% de metionina (CAS+Met) e de hidrolisado de baixo peso molecular suplementado com 0,08% de leucina, 0,14% de valina e 0,3% de metionina (HI+S).

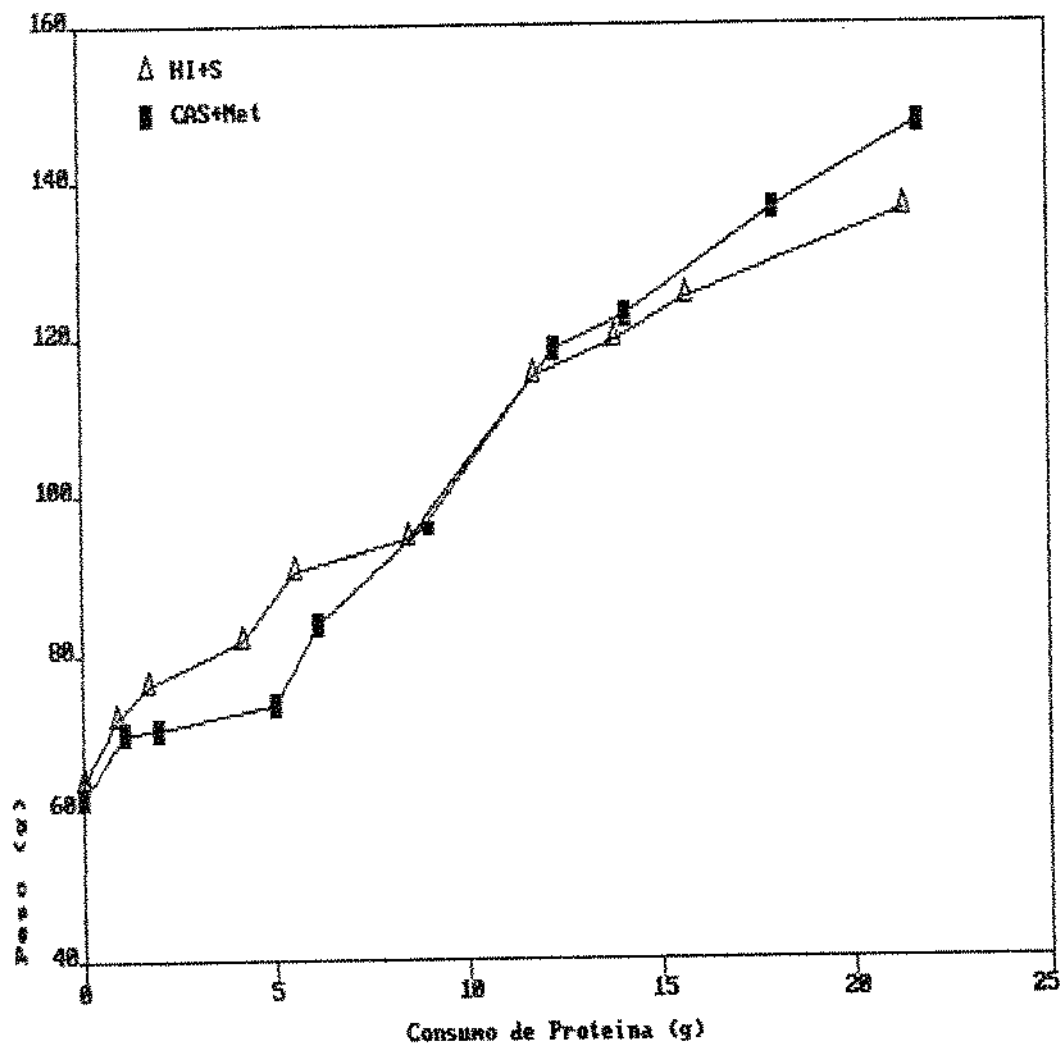


Figura 14. Ensaio Biológico III: Variação de peso médio de ratos Wistar em relação ao consumo de proteína, após 15 dias em dieta aprotéica, recuperados com dietas de caseína suplementada com 0,2% de metionina (CAS+Met) e de hidrolisado de baixo peso molecular suplementado com 0,08% de leucina, 0,14% de valina e 0,3% de metionina (HI+S).

tuou em crescimento ligeiramente superior dos animais alimentados com dieta CAS+Met.

O consumo de dieta pelos animais, neste terceiro ensaio, foi igual para as dietas contendo caseína (CAS+Met) e hidrolisado HI (HI+S). Nos outros ensaios biológicos, ao contrário, as dietas contendo HI foram menos consumidas. A eficiência da proteína (PER) da dieta HI+S, calculada para os 15 dias de recuperação, foi cerca de 86% do valor observado para a dieta CAS+Met. Como o crescimento não foi homogêneo ao longo do experimento, calculou-se a eficiência protéica para os primeiros 5 dias de recuperação (ganho de peso corporal/consumo de proteína) obtendo-se 4,68 para a dieta HI+S e 3,60 para a dieta CAS+Met ($P>0,05$). Entre o 5^o e o 10^o dia eficiência protéica foi de 3,98 e 4,37 ($P<0,05$) e entre o 10^o e o 15^o dias foi de 2,80 e 3,78 ($P>0,05$) para HI+S e CAS+Met, respectivamente. Estes valores, juntamente com as Figuras 13 e 14 sugerem a superioridade da dieta HI+S no estágio inicial de recuperação, esta vantagem desaparece com a recuperação nutricional do animal.

A suplementação do hidrolisado HI com metionina, valina e leucina aumentou o PER em cerca de 10% quando comparado à dieta HI+Met (suplementação de 0,1% de metionina) e em 30% em relação à dieta HI (sem suplementação), ambos resultados do Ensaio Biológico II.

Os resultados para o Balanço Nitrogenado (BN), Digestibilidade aparente (D_a), Valor Biológico aparente (VBA) e Utilização Líquida de Proteína (NPU) estão na Tabela 22. A D_a não mostrou diferença entre as duas dietas ($P>0,05$), alcançando valores de 91% para a CAS+Met e de 92% para HI+S. Animais alimentados com a

Tabela 22. Balanço nitrogenado (BN), Digestibilidade aparente (Da), Valor Biológico aparente (VBa) e Utilização Líquida de Proteína (NPU) para o Ensaio Biológico III^{1, 2}.

	Dieta	
	CAS + Met.	HI + S
N ingerido (mg)	1186±105	1163±52
N urinário (mg)	132±17	254±20
N fecal (mg)	108±17	93±12
BN (mg)	947±105 ^a	816±62 ^b
Da	90,8±1,2 ^a	92,0±1,3 ^a
VBa	87,8±1,6 ^a	76,2±2,3 ^b
NPU	87,8±1,6 ^a	70,1±2,7 ^b

¹média ± desvio padrão de 5 animais.

²letras iguais na mesma linha, não há diferença significativa (P>0,05).

dieta HI+S apresentaram excreção de nitrogênio urinário 2,6 vezes maiores que o observado para animais em dieta CAS+MET. Como consequência, os índices relacionados ao balanço nitrogenado mostraram-se inferiores ($P < 0,05$) aos da CAS+Met. Ao contrário do que foi observado para o PER, o VBa e NPU da dieta HI não melhoraram em função da complementação aminoacídica quando comparados aos valores obtidos no experimento anterior (Ensaio Biológico II).

5. DISCUSSÃO

5.1. Hidrólise enzimática do isolado protéico de soja (IPS) com pancreatina e obtenção de um hidrolisado de baixo peso molecular

A escolha do isolado protéico de soja como matéria-prima para obtenção de hidrolisados para nutrição clínica, objetivo do presente trabalho, foi devido, principalmente, à grande disponibilidade deste produto no Brasil, ao contrário de outras proteínas normalmente utilizadas na produção de hidrolisados, caseína e lactoalbumina, praticamente inexistentes no país. Por outro lado, a produção e utilização de hidrolisados enzimáticos de proteína de soja para nutrição clínica são ainda pouco conhecidos, existindo poucas referências na literatura (Imondi & Stradley, 1974; Taudorf *et alii*, 1984; Adler-Nissen, 1985; Ovesen & Allinstrup, 1992), enquanto que aspectos de produção de hidrolisados de caseína (Clegg & McMillan, 1974; Knights, 1985) e de sua eficácia nutricional já estão bem estabelecidos (Knights, 1985; Freitas, 1991).

Estudos de digestibilidade *in vitro* tem demonstrado a importância da utilização de enzimas de especificidade mais próxima possível as existentes no trato gastro-intestinal para obter-se correlação com a digestão *in vivo* e utilização como índice de qualidade protéica (Freeman *et alii*, 1979; Marable & Sanzone, 1981). Hidrólise similar ao processo *in vivo*, com a utilização da pancreatina em conjunto com a pepsina foi descrito por Akesson & Stahmann (1964), Stahmann & Woldegiorgis (1975), Galeazzi (1981) e

Gauthier et alii (1986) para determinação da qualidade de proteínas.

Tendo em vista a inocuidade do uso de enzimas digestivas aliada à reprodução de um processo similar ao fisiológico, a pancreatina foi escolhida para a produção do hidrolisado de proteína de soja. A pepsina, contudo, não foi utilizada, já que levaria à necessidade de grandes variações de pH e consequentemente de eletrólitos além de não contribuir efetivamente para um aumento na hidrólise com a pancreatina (Gauthier et alii, 1986; Freitas, 1991). A pancreatina é, ainda, a enzima normalmente utilizada na obtenção de hidrolisados já testados e que estão sendo utilizados na nutrição clínica (Knights, 1985; Brady et alii, 1986).

Em geral, os estudos sobre hidrólise de proteínas abordam dois aspectos principais: o perfil cinético da reação de hidrólise de determinado sistema enzima-substrato (inibição do produto, inativação da enzima, adsorção) e contribuição à formulação de equações cinéticas que podem ser utilizadas no desenvolvimento de reatores ou na otimização da utilização da enzima.

O modelo cinético da hidrólise de proteína vem sendo sistematicamente estudado nos últimos 20 anos. Estudos cinéticos de reação de hidrólise foram realizados para diversos sistemas proteína-enzima. Os substratos que tem sido investigados incluem a proteína de soja (Iacobucci et alii, 1974; Adler-Nissen, 1977; Constantinides & Adu-Amankwa, 1980; Vorob'ev et alii, 1987), proteína de pescado (Archer et alii, 1973), proteína de carne

da curva de hidrólise, pois tem-se, na maioria dos casos, maior precisão no conhecimento da influência dos parâmetros de hidrólise na velocidade de reação, sendo os modelos cinéticos mais importantes no estudo qualitativo de reações de hidrólise (Adler-Nissen, 1985). Na aplicação industrial de enzimas, é de interesse que a reação seja considerada como um todo, e não apenas a velocidade inicial de reação. Este enfoque tem sido amplamente empregado, particularmente para obtenção de hidrolisados funcionais (Adler-Nissen, 1977; Adler-Nissen *et alii*, 1983; Chobert *et alii*, 1988a; 1988b), solúveis ou de baixo peso molecular (Cheftel *et alii*, 1971; Archer *et alii*, 1973; Clegg *et alii*, 1974; Ma *et alii*, 1983; Smith *et alii*, 1989).

O estudo da hidrólise do isolado protéico de soja com pancreatina, realizado no presente trabalho, seguiu o modelo quantitativo, com o estudo das influências da concentração de substrato e relação enzima/substrato nas curvas de hidrólise. As curvas de hidrólise obtidas neste trabalho, grau de hidrólise em função do tempo, para o sistema isolado protéico de soja-pancreatina, apresentaram a velocidade de reação diminuindo com o tempo tendendo, à atingir um patamar (Figura 2). Embora a forma das curvas de hidrólise seja característica de cada sistema enzima-proteína e das condições de reação como concentração do substrato, relação E/S, pH e temperatura, a hidrólise de proteínas como caseína, isolado protéico de soja, glúten, proteína de milho, concentrado protéico de peixe, não apresentam diferenças essenciais entre si (Adler-Nissen, 1977; Adu-Amankwa & Constantinides, 1980; Adler-Nissen, 1985)

O rápido decréscimo observado na velocidade de reação tem sido atribuído a um dos seguintes fenômenos: (1) diminuição das ligações peptídicas específicas da atuação da enzima; (2) inibição pelo produto e (3) inativação da enzima (Adu-Amankwa & Constantinides, 1980). Para Adler-Nissen (1985), no entanto, a forma da curva de reação de hidrólise de proteínas não se deve à inibição da enzima pelos produtos, e sim à competição entre o substrato original, proteína não hidrolisada, e os peptídios que são continuamente formados durante a hidrólise. A adição de enzima após 4 horas de reação (Figura 5) não alterou a velocidade de reação indicando que a diminuição da velocidade não foi devido à inativação da enzima, mas possivelmente à inibição pelo produto ou ainda à competição entre proteína hidrolisada e não hidrolisada.

O não controle do pH durante a reação, embora seja de importância para a produção de hidrolisado com baixo conteúdo de eletrólitos, possivelmente contribuiu para a diminuição da velocidade de reação. O pH 7,1, no início da reação é limite do pH ótimo das enzimas pancreáticas, entre 7 e 9 para tripsina e quimotripsina (Hung *et alii*, 1984). Após duas horas de reação, quando o pH atinge o valor de 6,6, a reação já estaria acontecendo em condições sub-ótimas de pH.

A diminuição do pH durante a reação, provocada pela quebra das ligações peptídicas e desprotonização dos grupos amino, estabilizou-se após 3 horas de reação, embora ainda houvesse intensa proteólise neste período. No entanto, a variação do pH não depende apenas da quebra das ligações peptídicas. É dependente do número e dos valores de pK dos grupos amino liberados, da capacidade

tamponante das cadeias laterais, inicialmente escondidas e expostas no início da reação e da capacidade tamponante das cadeias laterais expostas da proteína não hidrolisada (Mozersky & Panettieri, 1983).

Os experimentos de hidrólise são realizados, em sua quase totalidade, com pH constante durante a hidrólise com auxílio de um titulador automático (*pH-stat*). Este procedimento acarreta aumento de íons presentes, tornando difícil, por vezes, a utilização destes produtos na formulação de dietas. Hidrolisados que foram obtidos por reação com pH controlado e particularmente onde a separação da fração não hidrolisada foi feita por precipitação no *pI* apresentam entre 10 e 15% de sais (Adler-Nissen, 1985).

O aumento da concentração de substrato (S), não afetou a velocidade na primeira hora de reação, embora tenha provocado uma diminuição da velocidade ao longo da reação (Figura 5), resultando em diferenças de quase 60% entre o GH final da menor e da maior concentração utilizada, 3,5 e 7,5%. Este comportamento também foi observado na hidrólise de IPS com protease ácida (Constantinides & Adu-Amankua, 1980), IPS com alcalase (Adler-Nissen, 1985), lactoalbumina com alcalase (Smith *et alii*, 1989), tendo sido relacionado ao aumento da inibição da enzima pelo produto.

O aumento da relação E/S resultou no aumento do GH, não sendo proporcional, no entanto, ao aumento da relação e similar ao observado para inúmeros outros substratos e enzimas (O'Meara & Munro, 1984; Hernandez & Asenjo, 1982; Smith *et alii*, 1989).

Como era esperado, concomitante ao aumento do GH, houve modificação de outros índices como o aumento da solubilidade

do N em TCA 10% e a diminuição do comprimento da cadeia peptídica (CMP) (Figuras 2 e 6). A alta correlação encontrada entre GH e N solúvel em TCA (Figura 3) parece indicar que os peptídios formados nos estágios iniciais de hidrólise, serviram como substrato para a formação de peptídios menores, solúveis em TCA. Tal observação está de acordo com o mecanismo proposto para a hidrólise de substratos insolúveis, onde em um primeiro momento a enzima cliva a proteína insolúvel formando fragmentos grandes. Os polipeptídios formados, parcialmente solúveis, são então hidrolisados em peptídios menores. Em uma segunda reação mais lenta a proteína mais compacta é solubilizada pela enzima adsorvida (Constantinides & Adu-Amankwa, 1980; Adler-Nissen, 1985).

Como descrito anteriormente (item 4.1) o estudo das curvas de hidrólise teve como objetivo estabelecer as melhores condições para obter hidrolisado de baixo peso molecular. Foi utilizado informações obtidas do patamar formado na curva de hidrólise, que indicava o máximo de hidrólise que era possível obter nas condições utilizadas (S e E/S). A utilização da solubilidade em TCA para análise dos hidrolisados obtidos (Tabela 3), foi devido à sua capacidade de precipitar peptídios com cadeia maiores de 4 resíduos de aminoácidos (Greenberg & Shipa, 1979), podendo fornecer, de maneira indicativa, o rendimento da hidrólise em peptídios de baixo peso molecular. As condições escolhidas, 5,5% de substrato e relação E/S de 1/35, 37°C, em água deionizada sem controle de pH foram consideradas adequadas, tendo em vista a alta porcentagem de N solúvel em TCA e CMP entre 4 e 5 resíduos de aminoácidos. Estas condições foram utilizadas para a produção do hidrolisado, que envol-

via a separação da fração de peso molecular mais alto, etapa crítica no que se refere ao rendimento em proteína do processo escolhido.

Considerando-se a solubilização como rendimento do processo na obtenção de hidrolisado de baixo peso molecular, os valores entre 40,5 e 55,5%, estão abaixo dos 80% relatados por Freitas (1991) para a hidrólise da caseína com pancreatina. A solubilização de proteína de soja, utilizando diversas enzimas, parece ser inferior à caseína. Adler-Nissen (1985), comparou o índice de solubilidade de hidrolisados de caseína de mesmo grau de hidrólise, obtidos com alcalase, tripsina e sumizima, encontrando valores 20% maiores para a caseína. Ao contrário, o N solúvel em TCA, em relação ao N presente na fração sobrenadante após precipitação no ponto isoelétrico, foi superior para o IPS, para todas as condições utilizadas (*ibid.*). Experimentos de digestibilidade *in vitro*, também tem demonstrado a menor susceptibilidade da proteína de soja à hidrólise enzimática (Akeson & Stahmann, 1964; Hsu et alii, 1977; Bodwell et alii, 1980).

Outros trabalhos indicam maior solubilização da proteína de soja. Kim et alii (1990), por exemplo, obtiveram solubilização de IPS com tripsina, quimotripsina e alcalase superior à 80%. Deve-se considerar que as metodologias utilizadas pelos diversos autores foram diferentes, dificultando a comparação.

A utilização de três diferentes tipos de isolado para a produção do hidrolisado mostrou que, sob as mesmas condições, foram obtidos produtos com características ligeiramente diferentes. O produto Proteimax 90-HE foi o que apresentou menor GH. Estas di-

ferências podem ser creditadas aos tratamentos feitos durante a produção do isolado protéico, que poderiam facilitar o ataque das enzimas devido à desnaturação. A presença dos inibidores de tripsina foi maior no isolado Proteimax 90-HG do que no isolado Proteimax 90-HE (Tabela 7), sugerindo que o grau de hidrólise alcançado não teve influência deste fator anti-nutricional. Estes resultados levaram à escolha do isolado Sanprosoy 90-NB para a produção do hidrolisado e posterior caracterização bioquímica e nutricional.

5.2. Caracterização Bioquímica do IPS e dos hidrolisados HI (baixo PM) e Ppt (alto PM)

Em função do processo de hidrólise, que envolveu não apenas a proteólise, mas também uma etapa de fracionamento, os hidrolisados obtidos apresentaram características diferentes da matéria-prima utilizada, o IPS. Além das modificações de peso molecular, os hidrolisados obtidos apresentaram diferenças na composição em aminoácidos, na presença de fatores anti-nutricionais e eletrólitos.

O conteúdo de inibidores de tripsina observado para 2 tipos de IPS utilizados, Proteimax 90-HG e Proteimax 90-HE, foi bastante elevado, equivalendo à atividade antitriptica de farinha de soja crua, entre 152,9 e 307,5 UTI/mg de proteína, determinada em cinco variedades brasileiras de soja (Prado *et alii*, 1980). É esperado e tolerado uma certa quantidade de IT em produtos comerciais de soja que depende do tratamento térmico efetuado no produto (Rackis *et alii*, 1975; Liener, 1979). Em produtos destinados ao

consumo humano, o inibidor deve ser praticamente inativo, contendo entre 5 e 33% da atividade ant-tríptica da soja crua (Liener, 1981; 1986). Muitas vezes, no entanto, não há uma etapa de tratamento térmico em alguns tipos de isolados e concentrados protéicos de forma a reter ao máximo as propriedades funcionais das proteínas. Nestes casos, os IT podem ser parcialmente removidos com o soro obtido na produção do isolado, ou ainda considera-se que serão inativados pelo aquecimento dos produtos aos quais for incorporado (Snyder & Kwon, 1987). Para o Sanprosoy 90-NB a atividade encontrada, 72,17 UTI/mg de proteína, foi bastante inferior aos outros isolados, estando de acordo com a redução esperada em relação à matéria-prima.

Quanto aos hidrolisados obtidos a partir destes isolados, a diminuição da atividade antitriptica foi resultado, possivelmente, da formação do complexo entre inibidor de tripsina e a tripsina presente na pancreatina. O baixo conteúdo de inibidores de tripsina no isolado Sanprosoy 90-NB assim como no hidrolisado resultante foram decisivos na escolha desta matéria prima para os ensaios biológicos e de caracterização.

Desta forma, o fitato, outro fator anti-nutricional presente na soja, foi determinado apenas no Sanprosoy 90-NB e seus hidrolisados. O teor de fitato presente em concentrados e isolados depende basicamente do processo de obtenção, podendo co-precipitar com a proteína, dependendo do pH e concentração de cátions (de Rham & Jost, 1979; Frattley et alii, 1982). Isolados protéicos de soja contém entre 1,5 e 2% de fitato (Brooks & Morr, 1984). Saterlee & Abdul-Kadir (1983) encontraram para o IPS (Promine D-Cental Soya,

Fort Wayne, IN) 11,4 mg de fitato/g de proteína, semelhante ao observado para o Sanprosoy 90-NB que foi 12,14 mg de fitato/g de proteína. No hidrolisado HI foi encontrado 2,6 vezes mais fitato que no IFS. O pH, próximo do neutro, utilizado no processo de obtenção do hidrolisado fez com que o complexo fitato-proteína permanecesse solúvel, aumentando sua concentração nesta fração e diminuindo de forma acentuada na fração insolúvel (Ppt). Adler-Nissen (1985) obteve um hidrolisado de proteína de soja praticamente isento de fitato utilizando precipitação ácida para separar a fração de baixo peso molecular.

O alto conteúdo de sais, apesar de não ser um fator anti-nutricional, deprime o crescimento de animais. Steinke (1977), relatou a diminuição de 15% do FER da caseína quando adicionado 5 mmol de sódio por grama de proteína e de 35% com adição da mesma quantidade de malato de sódio. Portanto, o processo de hidrólise enzimática com controle de pH e precipitação da fração insolúvel no ponto isoelétrico são responsáveis pelo alto conteúdo de minerais presentes nos hidrolisados protéicos. Particularmente Na e Cl provenientes do NaOH e HCl utilizados para o ajuste de pH nas reações enzimáticas e separação das proteínas no ponto isoelétrico contribuem para a alta concentrações de minerais. Adler-Nissen (1985) reportou a presença de 100 mg de sódio/g de proteína em hidrolisados de proteína de soja obtido por ação da alcalase com controle de pH. Este teor de minerais, segundo o mesmo autor, não causa qualquer efeito deletério nos órgãos, rim e fígado, ou na concentração de hemoglobina e proteína sérica dos animais. Cheryan & Deeslie (1983) também observaram alto conteúdo de minerais presentes em hidrolí-

sados obtidos com controle de pH, utilizando ultrafiltração para a separação da proteína não hidrolisada. O procedimento de hidrólise utilizado no presente trabalho para a obtenção de hidrolisado protéico permitiu minimizar a presença de eletrólitos pela não utilização do controle de pH (*pH stat*) durante a hidrólise e também na etapa de separação, pela utilização apenas de tratamento térmico para a coagulação da proteína não hidrolisada.

O teor de minerais encontrado no hidrolisado HI foi superiora ao da matéria-prima e similar ao obtido por Freitas (1991) para hidrolisado pancreático de caseína. Em relação ao sódio, obteve-se para o hidrolisado HI, 10,67 mg/g de proteína, muito inferior às 100mg /g de proteína citado por Adler-Nissen (1985). Em um produto formulado contendo hidrolisado pancreático de lactoalbumina como única fonte protéica (Pepti Diet-Support Produtos Nutricionais) o conteúdo reportado de Na e de K foi de 21mg/g de proteína e 20mg/g de proteína respectivamente. Esses valores são superiores aos encontrados no hidrolisado HI, uma vez que o conteúdo de K foi de 9,5 mg /g de proteína. Segundo o Nutritional Research Council (1980) a ingestão segura de eletrólitos para adultos saudáveis é de 1100-3300mg/dia de sódio, 1875-5625 mg/dia de potássio e 1700-5100 mg/dia de cloreto. A obtenção de hidrolisados com baixo conteúdo de sais permite seu aproveitamento em tipos diferentes de formulações, em especial aquelas para pacientes com restrição à ingestão de Na e K, bem como contribui para a diminuição da osmolaridade do produto.

A composição em aminoácidos do IPS (Sanprosoy 90-NB. Tabela 5) está de acordo com o reportado na literatura (Adler-Nis-

sen, 1985). A composição de isolados e concentrados protéicos de soja, no entanto, varia com o tipo de processamento utilizado para a obtenção do produto (Finot, 1983). As diferenças do perfil aminoacídico encontradas entre o IPS e os hidrolisados HI e Ppt foram resultantes principalmente da atuação e especificidade das enzimas pancreáticas.

A pancreatina é formada por uma série de enzimas, sendo as proteolíticas de interesse as endopeptidases quimotripsina e tripsina, e as exopeptidases carboxipeptidase-A e carboxipeptidase-B. A quimotripsina apresentam alta especificidade para a hidrólise de ligações peptídicas onde participam aminoácidos aromáticos e a tripsina onde há a participação de aminoácidos básicos. A carboxipeptidase-A cliva as ligações onde o aminoácido C-terminal é aromático ou ramificado e a carboxipeptidase-B, onde o C-terminal é um aminoácido básico (Ambler, 1967; White et alii, 1978).

O hidrolisado Ppt, composto pela proteína apenas parcialmente hidrolisada, apresentou composição bastante semelhante ao IPS. Já o hidrolisado HI, obtido pela liofilização da proteína solubilizada pela ação enzimática, apresentou diferenças em relação ao IPS e Ppt, principalmente por apresentar menor concentração de aminoácidos essenciais (AAE) (Tabela 5). A composição aminoacídica das frações obtidas por cromatografia de exclusão (Tabela 8) mostrou que os aminoácidos aromáticos e ramificados estavam presentes de forma mais representativa nas frações compostas de pequenos peptídios e aminoácidos livres (frações 3, 4 e 5, Tabela 8) enquanto os aminoácidos básicos estavam em maior quantidade nas frações 1 e 2, eluição próxima à exclusão molecular, ao redor de 5000 dal-

tons. Aminoácidos aromáticos e ramificados representaram 27% dos aminoácidos totais do IPS, sendo que destes 26% se encontravam na forma livre no hidrolisado HI. Aminoácidos básicos, lisina e arginina, representaram 12,5% do total, 17% dos quais se encontravam na forma livre. O perfil de AAL do hidrolisado HI, está qualitativamente de acordo com a especificidade das exopeptidases.

Esta maior contribuição relativa de aminoácidos aromáticos e ramificados na composição dos AAL parece indicar uma maior atividade da carboxipeptidase A. No entanto, a atividade desta enzima depende da atividade de uma endopeptidase, a quimotripsina, para que haja formação de peptídios que tenham no C-terminal os aminoácidos de sua especificidade. A pequena contribuição da lisina e da arginina na forma livre em relação ao seu conteúdo total, sugeriram baixa atividade da carboxipeptidase B ou ainda baixa atividade da tripsina que contribuiria para a formação de peptídios com lisina ou arginina em sua parte C-terminal. Esta suposição é ainda reforçada pela pequena presença de aminoácidos aromáticos nas frações de maior peso molecular, indicando baixa proporção de possíveis ligações não clivadas pela quimotripsina e a presença bastante significativa de aminoácidos básicos nestas mesmas frações indicando a baixa participação da tripsina.

Kim *et alii* (1990), ao contrário do que foi observado neste trabalho, obtiveram maior degradação proteolítica de um isolado protéico de soja comercial, medida por grau de hidrólise (GH) ou por solubilização da proteína com tripsina do que com quimotripsina, sendo que ambas as enzimas apresentaram maior atividade sobre a fração 7S. Hidrolisados de proteínas de origem animal, ob-

tidos pela ação da pancreatina, também mostraram maior atividade da tripsina. Resíduo de carne hidrolisado com pancreatina (Lamounier, 1984) apresentou 43% dos aminoácidos básicos na forma livre (11,5% de lisina e 31,6% de arginina), seguido pela leucina, 19,9% e pelos aminoácidos aromáticos, fenilalanina 7% e tirosina 8%. Lalasides et alii (1978) observaram maior liberação dos aminoácidos básicos lisina e arginina na hidrólise de concentrado de peixe com pancreatina do que o para os aminoácidos aromáticos e ramificados. Resultados semelhante foram obtidos para hidrólise de caseína com pancreatina, onde a lisina e a arginina se encontravam em grande parte, acima de 50%, na forma de aminoácidos livres (Freitas, 1991).

Esta baixa participação da tripsina na hidrólise do IPS tem como causa possível a atividade dos IT presentes no isolado utilizado para a produção do hidrolisado, Sanprosoy 90-NE (Tabela 7). Experimentos *in vitro* com este inibidor tem demonstrado uma reação estequiométrica instantânea e irreversível entre a enzima e o inibidor, formando um composto estável que não se dissocia exceto em condições fortemente ácidos. Já, o ácido fítico parece não afetar a atividade enzimática da pancreatina (Inagawa et alii, 1987).

A inativação dos fatores antinutricionais, particularmente dos IT, deve contribuir para a melhor utilização das enzimas existentes na pancreatina e também para a obtenção de hidrolisados com melhor rendimento em peptídeos de baixo peso molecular. Este aspecto é bastante importante pois, para alimentação enteral, o número de aminoácidos nas cadeias peptídicas assume um papel significativo pois a capacidade e rapidez de absorção pela mucosa

intestinal estão intimamente relacionadas ao número de resíduos de aminoácidos existentes nas cadeias peptídicas, sendo que di e tri peptídios são mais rapidamente absorvidos que os tetra e penta peptídios (Silk *et alii*, 1985; Grimble *et alii*, 1987).

Não apenas a capacidade de absorção dos peptídios pela mucosa intestinal mas também as propriedades funcionais de hidrolisados protéicos parecem ser governados em grande parte por seu peso molecular (Adler-Nissen, 1985). Jost & Monti (1982) observaram correlação positiva entre a atividade surfactante de proteínas e o tamanho médio da cadeia peptídica. Lee *et alii* (1987), reportaram que para um hidrolisado apresentar boa capacidade de emulsificação, os peptídios deveriam ter pelo menos 20 resíduos de aminoácidos. Hidrolisados de proteína contendo peptídios com peso molecular entre 1000 e 5000 daltons são rapidamente absorvidos pela pele e cabelo, tendo ampla utilização na indústria de cosméticos (Johnson, 1980).

A determinação de peso molecular de proteínas pode ser feita através de técnicas como a cromatografia de exclusão molecular e a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. No entanto, aparecem dificuldades quando estes métodos são aplicados para peptídios de baixo PM. A largura dos poros dos géis usados na eletroforese é grande e muitos géis usados em cromatografia de exclusão não apresentam características apropriadas para separação de material de pequeno PM (Shioya *et alii*, 1982). Interações iônicas e hidrofóbicas entre o soluto e gel utilizado no empacotamento de colunas ficam mais pronunciadas na separação de peptídios e a relação logarítmica entre tamanho ou PM e posição de eluição acaba não mais

existindo (Myers *et alii*, 1974; Shioya *et alii*, 1982). Este efeito, resultado das diferenças na composição aminoacídica, particularmente em relação à resíduos de aminoácidos aromáticos, predominaria sobre o comportamento normal de permeação em gel que é dependente do tamanho dos peptídios (Myers *et alii*, 1974).

Mesmo levando-se em conta estes problemas, a separação em colunas de exclusão molecular tem sido um instrumento importante na caracterização de hidrolisados, não apenas diretamente na determinação do peso molecular, mas como um instrumento de separação da amostra em frações com características de eluição semelhantes (Rothenbuhler *et alii*, 1979). A técnica adotada neste trabalho, associando cromatografia em Sephadex G-25 à análise de grupos amino livres e totais nas frações obtidas, foi utilizada por diversos pesquisadores para determinar o comprimento das cadeias peptídicas. Chen *et alii* (1962) utilizou técnica semelhante para caracterização dos produtos da digestão protéica *in vivo*. Posteriormente, Grimble *et alii* (1987) caracterizaram as cadeias peptídicas de hidrolisados enzimáticos com objetivo de estudar a cinética de absorção dos peptídios pela mucosa intestinal. Myers *et alii* (1974) e Lamounier (1984), Freitas (1984, 1991) utilizaram esta técnica na caracterização de hidrolisados utilizados na nutrição clínica. Grimble *et alii* (1987), consideraram esta técnica a mais confiável quando existe necessidade de exatidão na determinação de peso molecular ou comprimento da cadeia peptídica e não apenas no estabelecimento de uma faixa de peso molecular.

O perfil de peso molecular obtido pela análise do cromatograma mostrou algumas discrepâncias com aquele apontado pela

análise de cada fração obtida por cromatografia. A fração 1, correspondente ao pico de exclusão molecular, era composta por cadeias peptídicas com 18 resíduos de aminoácidos em média (Tabela 12), que equivaleria, aproximadamente, a 2000 daltons (considerando peso médio dos aminoácidos como 110 daltons), bastante abaixo dos 5000 daltons esperado para esta fração que corresponde ao peso de exclusão da coluna. Resultados semelhantes foram obtidos por Jost & Monti (1977) e Lamounier (1984) sendo que o último observou peptídios com 17 resíduos de aminoácidos em fração equivalente. Segundo Adler-Nissen (1985) a cromatografia em gel usando eluentes como soluções de ácido acético e tampão fosfato, não exclui a possibilidade de haver interações entre os peptídios, aumentando seu peso molecular aparente. Outra explicação possível é a existência de peptídios unidos por ligação dissulfeto, havendo a determinação de 2 grupos alfa-amino para um único peptídio (Myers *et alii*, 1974; Lynch *et alii*, 1977). Lynch *et alii* (1977) observaram que na hidrólise de glicinina com tripsina, quando era feito tratamento alcalino prévio para quebra das ligações dissulfeto, a formação de peptídios com peso molecular entre 5000 e 7000 daltons diminuía, havendo maior formação de peptídios com PM abaixo de 5000 daltons. Na fração 2, de PM entre 1500 e 5000 daltons, de acordo com o perfil cromatográfico, foi obtido comprimento médio de 12 resíduos, que equivaleria à cerca de 1300 daltons. A diferença do comprimento da cadeia observada entre as frações 2 e 3, com 12 e 5 resíduos de aminoácidos respectivamente, foi também observada por Lamounier (1984) assim como a adsorção dos aminoácidos aromáticos.

Outras discordâncias foram observadas entre as diversas formas de estimativas de peso molecular de hidrolisados utilizadas no presente trabalho. O índice de solubilidade do nitrogênio em TCA 10% para o hidrolisado HI foi cerca de 75% (Tabela 3). Segundo Greenberg & Shipe (1979), o peso molecular médio da fração solúvel em TCA 10% de um hidrolisado péptico de ovalbumina era de 330 a 380 daltons, o que corresponderia à peptídios contendo 3 ou 4 resíduos de aminoácidos. De acordo com a capacidade de precipitação do TCA reportada por aqueles autores, esperava-se que apenas 25% do hidrolisado HI tivesse peso molecular acima de 380 daltons. Pelo resultado da análise de comprimento médio da cadeia peptídica nas frações, no entanto, cerca de 50% dos peptídios estariam nesta faixa de peso molecular. Possivelmente a hidrólise com pepsina utilizada por Greenberg & Shipe (1979) não produziu peptídios com diversidade de peso molecular, como foi observado no presente trabalho.

A estimativa do comprimento médio (CMP), realizada nos experimentos conduzidos para obtenção do hidrolisado (100/GH, Adler-Nissen, 1985) foi de 4 a 5 resíduos de aminoácidos na cadeia peptídica para o hidrolisado HI (Tabela 4). Calculando-se a média ponderal do comprimento médio das cadeias peptídicas obtido em cada fração, no entanto, obteve-se 9 resíduos de aminoácidos, sendo também constituído por 13% de aminoácidos livres. Esta discordância de resultados deve-se ao fato de aproximadamente 50% dos grupos amino determinados serem provenientes de aminoácidos livres (Tabela 5). Levando-se em conta a contribuição dos aminoácidos livres, obtem-se como média do tamanho das cadeias peptídicas 9 resíduos de aminoácidos, convalidando os resultados obtidos pela análise das frações.

Esta comparação sugere que o método proposto por Adler-Nissen (1985) para determinação do comprimento médio das cadeias peptídicas não se aplica quando enzimas como a pronase ou a pancreatina, que possuem endo e exo peptidases, são utilizadas para a hidrólise de proteínas.

Os AAL foram eluídos em sua quase totalidade na fração 4, enquanto os aromáticos, fenilalanina e tirosina preferencialmente na fração 5 e o triptofano na fração 7, evidenciando fenômeno de adsorção. Segundo Freitas (1991), a possibilidade de separação dos aminoácidos aromáticos dos demais é um importante aliado na preparação de hidrolisados com baixo teor de aromáticos destinados à portadores de fenilcetonúria.

5.3. Avaliação Nutricional

Tendo em vista a finalidade exclusivamente nutricional do hidrolisado elaborado neste trabalho, o estudo de seu desempenho no crescimento e recuperação de animais era de extrema importância. Sabe-se que a composição em aminoácidos de uma proteína bem como sua biodisponibilidade são fatores determinantes de sua qualidade nutricional (Young et alii, 1981). A biodisponibilidade é principal, mas não inteiramente, função da digestibilidade, ficando em segundo lugar o padrão de proporcionalidade dos aminoácidos (Kies, 1981). Outro aspecto relevante, particularmente em relação à qualidade de proteínas de origem vegetal é a presença de fatores antinutricionais (Liener, 1981). A forma molecular da proteína (integral, peptídios ou aminoácidos livres) é também um importante pa-

râmetro que tem reflexo na qualidade das proteínas (Kies, 1981).

O Ensaio Biológico I, realizado com animais em crescimento durante 28 dias, de acordo com a metodologia clássica para determinação do PER (AOAC, 1975), serviu principalmente, para avaliação geral e conhecimento das mudanças no valor nutricional devido ao processo de hidrólise.

As dietas à base de proteína de soja (IPS e hidrolisados) obtiveram PER comparáveis aos valores reportados na literatura para isolado protéico de soja, entre 1,7 e 2,2 (Bodwell & Marable, 1981; Marchini *et alii*, 1985; Sarwar *et alii*, 1989). No entanto, como a hidrólise levou à diferenças no perfil aminoacídico, nos fatores antinutricionais e no teor de eletrólitos, era esperado que também surgissem diferenças entre a qualidade destas proteínas. O hidrolisado HI apresentou o menor PER e a menor relação AAE/AAT e os aminoácidos sulfurados e a valina abaixo do padrão da NRC (1980). O hidrolisado HNS e o IPS, com composição em aminoácidos semelhantes, alcançaram valores de PER similares. A hidrólise enzimática das proteínas parece não contribuir para o aumento do PER, embora alguns autores (Marchini *et alii*, 1985; Ruiz, 1985), relatem aumento substancial do PER da proteína de soja devido à hidrólise.

Além dos efeitos inibitórios sobre as enzimas biológicas, os inibidores de tripsina são conhecidos por atuarem no sistema fisiológico de animais de laboratório. A atividade anti-trípica apresentada pelo Sanprosoy 90-NB e seus hidrolisados, utilizados nos ensaios biológicos, não provocaram problemas nutricionais. Não foram observadas alterações no pâncreas, ao nível macroscópico (Ensaio Biológico I) ou ainda ao nível microscópico (Ensaio Bioló-

gico II). Este resultado está de acordo com Rackis *et alii* (1975) que observaram que a hipertrofia do pâncreas não ocorria quando ratos eram alimentados com farinha de soja que havia perdido 54% da atividade dos IT, equivalente ao valor de 51 UTI/mg de proteína e o PER máximo ocorria com a destruição de 80% da atividade dos inibidores de tripsina, correspondente a 22 UTI/mg de proteína. Churella *et alii* (1976), demonstraram que o tratamento envolvido no processamento e esterilização de formulados infantis contendo isolado protéico de soja, reduziu a atividade do IT a 10% da atividade inicial e que a atividade residual não produziu hipertrofia do pâncreas de ratos ou redução de peso do animal.

Por outro lado, a qualidade da proteína de soja parece não ser afetada pelo teor de fitato pois o mesmo produto com teores diferentes, 11,4 e 2,1 mg de fitato/g de proteína, não apresentaram diferenças em ensaios biológicos de digestibilidade, PER e VB (Saterlee & Abdul-Kadir, 1983). Outros trabalhos, no entanto, indicam uma pequena diminuição da digestibilidade *in vivo* de proteínas (Abdul-Kadir, 1980, *apud Ritter et alii*, 1987; Serranio *et alii*, 1985). Contudo o fitato parece não interferir na ação de enzimas proteolíticas como a pancreatina e alcalase (Inagawa *et alii*, 1987). No presente trabalho, não se verificou alteração da digestibilidade (Ensaio Biológico I) do hidrolisado HI, com alto teor de fitato, em relação as outras proteínas.

A alta digestibilidade encontrada para as dietas CAS e IPS está de acordo com os valores encontrados na literatura (Saterlee & Abdul-Kadir, 1983). Não houve diferenças entre a digestibilidade de proteínas integrais e hidrolisadas. Lalasides *et alii*

(1978) e Yamamoto *et alii* (1985), também haviam observado que a hidrólise prévia das proteínas de soja não afetava de forma significativa sua digestibilidade. A presença dos fatores anti-nutricionais também não influenciou neste índice de qualidade. Os IT podem causar a diminuição da digestibilidade pela maior perda de N fecal (Liener, 1981) e o fitato também tem sido associado à menor digestibilidade de proteínas (Anderson, 1985).

Os resultados do Balanço Nitrogenado (BN), Valor Biológico aparente (VBa) e Utilização Líquida de Proteína (NPU) mostraram que a utilização do hidrolisado HI, embora com valores inferiores ao das outras proteínas utilizadas no experimento, foi semelhante ao observado para hidrolisados de proteína de melhor qualidade. Lalasides *et alii* (1978) obtiveram para hidrolisado pancreático de proteína de peixe, 80% para VB e 76% para NPU. Os índices obtidos foram ligeiramente inferiores ao observado para hidrolisado pancreático de caseína complementado com aminoácidos livres, 82% para VB e 79% para o NPU, na dieta completa para alimentação enteral (Flexical-Mead Johnson) (*ibid*). Para o IPS e caseína, os valores encontrados estão de acordo com o reportado na literatura (Bodwel & Marable, 1981).

O consumo de hidrolisados enzimáticos, de origens diversas, não causam quaisquer modificações adversas nas condições físicas dos animais. Ballester *et alii* (1977), alimentou ratos com hidrolisado de peixe obtido pela ação da bromelina ao nível de 10, 20 e 30% da dieta durante 40 semanas. Os autores não observaram qualquer alteração histológica ou morfológica nos órgãos examinados ou ainda na reprodução e lactação destes animais. Em experimentos

de curta duração (Lalasides *et alii* 1978; Ruiz, 1985; Adler-Nissen, 1985), também não foi constatada qualquer alteração, estando de acordo com o observado no presente trabalho, onde não foi constatada alterações ao nível macroscópico nos órgãos dos animais alimentados por 28 dias com dietas contendo hidrolisado pancreático de proteína de soja (Ensaio Biológico I).

A eficácia de fontes protéicas em suporte nutricional não pode ser avaliada apenas em animais ou humanos saudáveis. O sucesso clínico deve ser julgado com base na repleção da massa celular medida como aumento das proteínas viscerais, balanço nitrogenado e medidas antropométricas (Meguid *et alii*, 1984). Ratos que tenham passado por depleção protéica ou jejum prolongado (3 a 7 dias), tem sido um modelo bastante utilizado para avaliação e/ou comparação da qualidade nutricional de fontes protéicas em diferentes formas moleculares: proteínas integrais, proteínas hidrolisadas (forma peptídica) e aminoácidos livres (Itoh *et alii*, 1974; Yamamoto *et alii*, 1985; Poullain *et alii*, 1989). Desnutrição e jejum induzem à modificações metabólicas, redução da massa muscular, do tecido adiposo, diminuição da capacidade imunológica e das funções do trato digestivo (Montgomery, 1962; Altmann, 1972; Gorostiza *et alii*, 1985). Alterações do intestino, notadamente dos ratos, tem sido alvo de inúmeros estudos que relatam atrofia da mucosa com diminuição da altura das criptas e das vilosidades, consequência da redução da velocidade de renovação das células das criptas (Altmann, 1972; Gorostiza *et alii*, 1985). Diminuição da capacidade de secreção (Altmann, 1972), da digestão (Kotler *et alii*, 1982) e da absorção (Lis & Matthews, 1972) são também resultantes do processo

de desnutrição. Desta forma, os estudos são feitos sob *deficit* protéico, condição frequentemente observada em pacientes convalescentes de doenças, acidentes, no período pós operatório, ou mesmo com problemas metabólicos, de digestão e absorção (Young et alii, 1975; Meguid et alii, 1983).

A depleção protéica foi utilizada, então, como estratégia para avaliação nutricional dos hidrolisados pancreáticos de proteína de soja produzidos neste trabalho. A depleção protéica nos Ensaio Biológicos II e III provocou a perda de 22% do peso corporal inicial, comparável ao relatado na literatura para animais adultos após 20 dias sob as mesmas condições (Itoh et alii, 1974). A desnutrição também provocou a diminuição de 24% na altura das vilosidades do íleo (Ensaio Biológico II), resultado da atrofia da mucosa intestinal (Brown et alii, 1963). Este resultado parece indicar uma depleção protéica bastante grave pois a diminuição da altura das vilosidades, embora bastante rápida no duodeno, é lenta nas regiões distais (Altmann, 1972). Gorostiza et alii (1985) observaram, após jejum de 3 dias, redução de 30% na altura das vilosidades do jejuno e nenhuma alteração do íleo. Altmann (1972) relatou que após 7 dias de jejum houve perdas entre 21 e 35% da altura das vilosidades do íleo e 40% do duodeno. Estudos mostram que a hipofunção e atrofia morfológica do intestino delgado e pâncreas começam a se reverter entre 48 e 72 horas após a realimentação do animal em jejum prolongado (Adibi & Allen, 1970; Altmann, 1972; Gorostiza et alii, 1985).

Possivelmente, como consequência das alterações morfológicas e funcionais ocasionadas pelo *deficit* protéico, as

curvas de crescimento dos animais em recuperação (Ensaio Biológico II e III) foram diferentes da curva obtida para ratos normais (Ensaio Biológico I), onde o crescimento, desde o início do experimento, foi diferenciado em função da dieta. No Ensaio Biológico II, a dieta HI, que no cômputo geral foi a de menor desempenho, recuperou os animais de forma semelhante às outras até pelo menos o 2º dia de repleção (Figura 11), quando possivelmente se deu o início da reversão da atrofia e recuperação da mucosa intestinal propiciando a utilização da proteína de forma semelhante ao observado no Ensaio Biológico I. No Ensaio Biológico III, onde as diferenças nos teores de aminoácidos essenciais entre as dietas foram minimizadas, a recuperação ponderal foi superior até o 4º dia para os animais alimentados com a dieta HI+S. Em relação à dieta CAS+Met, somente a partir do 7º dia de repleção os resultados se igualaram ao HI+S. O coeficiente de utilização protéica calculado para os cinco primeiros dias de recuperação (item 4.3.3.) 4,68 para a dieta HI+S e 3,6 para a dieta CAS+Met, comprovaram a superioridade da primeira na recuperação dos animais desnutridos já que propiciou ganho ponderal mais rápido, fato de grande importância para o sucesso clínico de um formulado.

A recuperação mais rápida de peso dos animais alimentados com dieta HI+S está de acordo com o reportado por Poullain et alii (1989). Estes autores observaram maior ganho de peso em ratos alimentados com peptídios (hidrolisado de lactoalbumina) do que com dietas contendo proteína integral após jejum de 72 horas. Yamamoto et alii (1985), no entanto, não observaram diferença na recuperação de ratos com deficiência protéica alimentados com

dieta protéica, peptídica e aminoácídica de composição equivalente. Para animais que sofrerem cirurgias de modo a diminuir sua capacidade de absorção, por ressecção intestinal extensa (Lamounier, 1984; Yamamoto *et alii*, 1985) ou de digestão por insuficiência pancreática (Imondi & Stradley, 1974), a recuperação com dietas contendo hidrolisados de proteína de soja foi superior à dietas contendo proteínas integrais ou aminoácidos livres. Humanos com doença de Chron e má absorção alcançaram melhor balanço nitrogenado com dieta peptídica (Criticare-HN, Mead Johnson Nutritional Division) do que com dietas contendo aminoácidos ou proteína integral (Smith *et alii*, 1982). Em trabalho recente, Ovesen & Allingstrup (1992) relataram que uma dieta comercial contendo hidrolisado parcial de proteína de soja (Top Up-Novo-Nordisk) mostrou maior eficácia na suplementação nutricional de longo prazo em pacientes com cancer com acentuada perda de peso que outra dieta, com igual composição contendo proteína de leite intacta (Salvimulsin-MCT-Ercopharm)

Em humanos saudáveis os trabalhos realizados tem apresentado resultados contraditórios. Moriarty *et alii* (1985) não observaram diferenças no balanço nitrogenado e no ganho de peso utilizando proteína nas suas diversas formas moleculares enquanto Patel *et alii* (1973) e Silk *et alii* (1979) obtiveram melhores resultados de recuperação com proteína integral seguido por peptídeos e aminoácidos.

As vantagens da utilização de hidrolisados protéicos na nutrição clínica tem sido estreitamente relacionadas ao tamanho dos peptídeos. A velocidade de absorção de nitrogênio é significativamente maior quando são ministrados peptídeos com 2 ou 3 resi-

duos de aminoácidos e mais lenta com peptídios com 4 ou 5 resíduos, mais ainda com vantagens cinéticas em relação à mistura equivalente de aminoácidos (Silk *et alii*, 1975; Adibi, 1985; Keohane *et alii*, 1985). Segundo Grimble *et alii* (1987), a administração de hidrolisados contendo peptídios com mais de 10 resíduos de aminoácidos não traria benefícios para a nutrição de indivíduos com baixa capacidade de absorção e hidrólise luminal. Keohane *et alii* (1985), no entanto, observaram que havia vantagem cinética na absorção, em relação à mistura equivalente de aminoácidos, de um hidrolisado pancreático de proteína de carne/soja/lactoalbumina contendo 15 a 20% de peptídios com peso molecular entre 500 e 2000 daltons e 40% de peptídios com FM superior à 2000 daltons. Embora diversos estudos indiquem que di e tri peptídios são absorvidos intactos pela mucosa do intestino delgado (Matthews, 1975; Silk *et alii*, 1985) evidências sugerem que as peptidases presentes na bordadura em escova da mucosa intestinal tem um papel importante na assimilação de peptídios maiores (Silk *et alii*, 1981). Sob a ótica do que foi exposto, espera-se que o hidrolisado HI, constituído por 24% de peptídios com média de 18 resíduos de aminoácidos, 26% com 12 resíduos, 30% com 5 resíduos e 13% de aminoácidos livres, apresente vantagens cinéticas de absorção comparáveis ao hidrolisado pancreático de carne/soja/lactoalbumina utilizado por Keohane *et alii* (1985), descrito anteriormente, já que apresentou perfil de peso molecular semelhante. Freitas (1991), obteve hidrolisado pancreáticos de caseína com 14% de aminoácidos livres 38% de peptídios com 2-9 resíduos de aminoácidos e 48% de peptídios com 10-23 resíduos de aminoácidos cuja avaliação nutricional mostrou resultados superiores à caseína

intacta e mistura de aminoácidos em ratos enterectomizados. O perfil de peso molecular de hidrolisados de caseína existente em formulados comerciais mostram 12% de aminoácidos livres 55% de peptídios com 2-9 resíduos de aminoácidos e 28% com 10-40 resíduos e 5% com mais de 40 resíduos de aminoácidos (Peptamen) ou ainda 60% de aminoácidos livres, 35% de peptídios com menos de 4 resíduos de aminoácidos e 5% com mais de 5 resíduos (Knights, 1985).

Outros fatores além do tamanho dos peptídios parecem estar envolvidos na utilização de nitrogênio na forma peptídica. No início da recuperação após depleção protéica severa, quando a capacidade de hidrólise luminal e absorção ainda devem estar comprometidas, animais desnutridos ou em jejum prolongado parecem guardar capacidade suficiente de digestão e absorção. Mesmo neste período inicial, a digestibilidade parece não ser afetada (Gorostiza *et alii*, 1985; Foullain *et alii*, 1989) e a excreção de nitrogênio fecal é a mesma independente da forma molecular da dieta (Pollain *et alii*, 1989). Tais fatos sugeriram que a recuperação mais rápida desses animais com dietas peptídicas deveria ter outros motivos além da vantagem cinética de absorção proporcionado pela presença de pequenos peptídios (Silk *et alii*, 1975; Matthews & Adibi, 1976; Meguid *et alii*, 1984; Keohane *et alii*, 1985). A síntese protéica é modificada por diferentes padrões de aminoácidos essenciais e não essenciais em circulação, que resultam das diferenças de velocidade de absorção dos aminoácidos na mucosa intestinal (Smith *et alii*, 1982). A recuperação seria então, função da utilização e não apenas da maior eficiência na absorção (Meguid *et alii*, 1984). A presença de maior quantidade de aminoácidos ramificados também contribui pa-

ra o aumento do balanço nitrogenado e síntese protéica (Meguid *et alii*, 1983; 1984). A rápida absorção de aminoácidos em um curto período de tempo e não em um período longo pode sobrecarregar a capacidade do organismo de usar eficientemente estes aminoácidos na síntese protéica, levando à desaminação e sua utilização como fonte de energia (Kies, 1981).

No presente estudo, animais alimentados com as dietas que continham hidrolisado HI apresentaram excreção de nitrogênio urinário maior que as demais dietas ficando em torno de 20% do nitrogênio ingerido (Ni) em todos os ensaios realizados, mesmo quando houve suplementação da dieta com aminoácidos livres (HI+Met e HI+S). Para a caseína, esta perda ficou em torno de 11% do Ni. Estes resultados, no entanto, não representam o período de recuperação, pois os balanços foram realizados na segunda semana de repleção. No Ensaio Biológico III, até o 4º dia de repleção houve maior ganho de peso com a dieta HI+S do que com CAS+Met. Diferenças na capacidade de absorção e/ou utilização desta fonte proteica entre animais em recuperação e recuperados foram, possivelmente, responsáveis por este resultado pois a formação de novas proteínas significa uma maior retenção de nitrogênio (Anderson *et alii*, 1969).

A suplementação da caseína com 0,2% de metionina (CAS+Met-Ensaio Biológico III) não mostrou vantagens na recuperação dos animais, já que foi próxima à observada para a caseína não suplementada (Ensaio Biológico II). A suplementação do hidrolisado HI com metionina resultou na elevação do PER no Ensaio Biológico II e possivelmente foi a responsável pela elevação do PER no Ensaio Bio-

lógico III. Com adição de 0,3% de metionina houve aumento de 30% do PER em relação ao HI sem suplementação, embora também tenha havido complementação da valina e da leucina. Em animais normais em crescimento foi observado que a suplementação da caseína com 0,2% de metionina causou aumento de 10 a 17% do PER (Sarwar *et alii*, 1989) e para proteínas de soja a adição de 0,3% resultou em aumento de quase 20% do PER (Kaapor & Gupta, 1975).

Os resultados da avaliação nutricional do hidrolisado HI, PER, VBa e NPU, quando comparados às outras dietas experimentais, ficaram em ligeira desvantagem, mesmo quando suplementados com os aminoácidos deficientes. Estes resultados, no entanto não refletem a capacidade de recuperação das proteínas estudadas. O hidrolisado HI suplementado (HI+S) promoveu ganho ponderal mais rapidamente e com menor ingestão que a caseína nos primeiros dias de recuperação, (Ensaio Biológico III).

A reabilitação nutricional de pacientes mal nutridos visa suprir as necessidades aumentadas devido à estados catabólicos e prover nutrientes na forma que possa ser absorvido pelo paciente. Quanto mais cedo um paciente receber um suporte nutricional adequado, maior será sua resistência à infecções, e menor o tempo de convalescença e recuperação (Chernoff, 1981; Schmidl *et alii*, 1988). Neste aspecto, a utilização do Hidrolisado HI, parece ser promissora, pois apresentou vantagens de recuperação em relação à caseína, proteína amplamente utilizada em formulações. Deve-se ressaltar ainda que a avaliação de proteínas de origem vegetal com ratos, leva à subestimar a qualidade desta proteína, já que as necessidades destes animais são maiores que a dos humanos, particular-

mente no que se refere aos aminoácidos sulfurados. O fato de alguns aminoácidos não terem alcançado os requerimentos da NRC (1980) não parece impedir a utilização do hidrolisado HI. A prática de suplementação da fonte protéica com aminoácidos é comum na formulação de dietas para a alimentação clínica, permitindo alcançar necessidades nutricionais específicas de cada paciente.

Quanto aos problemas nutricionais relacionados à ingestão de proteínas vegetais como a presença de fatores anti-nutricionais, deve-se salientar que a proteína de soja vem sendo utilizada tanto na alimentação de lactentes e crianças, como também na formulação de produtos para nutrição clínica, sem nenhum efeito adverso relatado. Quanto à presença de inibidores de tripsina no hidrolisado HI, a expressiva diminuição em relação ao IPS anularia qualquer efeito adverso que pudesse vir deste fator anti-nutricional. O aumento considerável de fitato teria que ser estudado quanto aos seus efeitos adversos, particularmente em relação à biodisponibilidade de minerais.

Cabe ainda destacar a importância da continuidade do presente trabalho no sentido de melhorar as condições de hidrólise de modo a se obter melhor rendimento em pequenos peptídios, estudar sua utilização em dietas hipoalergênicas, em formulados para fenilcetonúricos ou ainda para outros fins terapêuticos específicos. Abre-se ainda hoje as grandes possibilidades dos peptídios biologicamente ativos, cujos conhecimentos ainda estão restritos à caseína e lactoalbumina.

6. CONCLUSÕES

6.1. As condições de hidrólise escolhidas para a produção do hidrolisado pancreático de isolado protéico de soja, foram: concentração de substrato, 5,5%; relação E/S, 1/35, em água deionizada, sem ajuste de pH, a 37^o C durante 8 horas. Esta escolha foi feita tendo em vista a necessidade de obtenção de um produto com alto rendimento em peptídios de baixo PM e utilizasse condições de hidrólise com alta concentração de substrato e baixa relação E/S.

6.2. O hidrolisado de baixo peso molecular (HI) apresentou as seguintes características de distribuição de peso molecular: 23,7% com 18 resíduos de aminoácidos, 25,6% de peptídios com 12 resíduos de aminoácidos, 30% com peptídios com 5 resíduos de aminoácidos, 8% com 3 e 0,03% com 2 resíduos de aminoácidos. Os aminoácidos livres foram compostos principalmente de aminoácidos aromáticos e ramificados.

6.3. Em relação ao IPS, o hidrolisado HI apresentou as seguintes diferenças: diminuição da relação entre aminoácidos totais e aminoácidos essenciais, particularmente tirosina e fenilalanina; diminuição de 83% da atividade antitriptica e aumento da concentração de ácido fítico em 2,6 vezes.

6.4. A avaliação biológica demonstrou que, nos níveis encontrados, os inibidores de tripsina e fitato não afetaram a digestibilidade das proteínas. A resposta nutricional às dietas, foi diferente em

animais normais em crescimento da obtida por ratos que passaram por período de depleção protéica. Quando testado em ratos normais, o hidrolisado HI apresentou o menor desempenho nutricional. Em animais em depleção protéica o ganho de peso corporal dos animais em dieta foi semelhante ao das dietas contendo caseína ou isolado protéico de soja. Quando suplementado com 0,3% de metionina, 0,14% de valina e 0,08% de leucina, o hidrolisado HI recuperou os animais mais rapidamente que a caseína com 0,2% de metionina, sendo que a eficiência protéica nos cinco primeiros dias de recuperação foi significativamente superior à caseína suplementada.

6.5. O hidrolisado de baixo peso molecular HI apresentou característica de distribuição de peso molecular e resultados nutricionais que indicam a possibilidade de sua utilização em situações clínicas que requeiram a utilização de fonte protéica modificada.

6.7. A verificação de outros efeitos nutricionais possíveis causado pelo alto teor de fitato deve ser estudado. No processo de obtenção de hidrolisado de isolado protéico de soja com pancreatina, a presença de inibidores de tripsina bem como a de fitato devem ser melhor estudadas, particularmente em relação à alterações no perfil de distribuição de peso molecular e produtos de hidrólise.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADIBI, S.A. Intestinal phase of protein assimilation in man. Am. J. Clin. Nutr. 29:205-215, 1976.
- ADIBI, S. A. & ALLEN, R. Impaired jejunal absorption rates of essential aminoacids induced by either dietary caloric or protein deprivation in man. Gastroenterol. 59(3): 404-413, 1970.
- ADIBI, S.A. Absorption of products of protein digestion. In: FINLEY, J.W. & HOPKINS, D.T. eds. Digestibility and Aminoacids Availability in Cereals and Oilseeds. St. Paul, Minnessota, AACC, 1985, p. 285-295, .
- ADIBI, S.A. & KIM, Y.S. Peptide absorption and hydrolyses. In: JOHNSON, L.R. ed. Physiology of intestinal tract. Raven Press, New York, 1981, p. 1073-1095.
- ADIBI, S.A. & MERCER, D.W. Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentratrion after meals. J. Clin. Invest. 52: 1586-1594, 1973.
- ADIBI, S.A. & SOLEIMANPUR, M. Functional characterization of dipeptide transport system in human jejunum. J. Clin. Invest. 53: 1368-1374, 1974.
- ADKINS, J.S.; WETZ, J.M.; BOFFMAN, R.H.; HOVE, E.L. Influence of addition of water and "nonessential" nitrogen on growth of rats fed low levels of essential L-amino acids. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 126: 500-504, 1967.
- ADLER-NISSEN, J. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. J. Agric. Food Chem. 24: 1090-1093, 1976.

- ADLER-NISSEN, J. Enzymatic hydrolysis of food protein. Process Biochem 12(6): 18-23, 1977.
- ADLER-NISSEN, J. Enzymatic hydrolysis of soy protein for nutritional fortification of low pH foods. Ann. Nutr. Alim. 32: 205-216, 1978.
- ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. J. Agric. Chem. 27(6): 1256-1262, 1979.
- ADLER-NISSEN, J. Enzymic hydrolysis of food proteins. Londres, Elsevier, 1985, 426p.
- ADLER-NISSEN, J. Relationship of structure to taste of peptides and peptide mixture. In: FEENEY, R.E. & WHITAKER, J.R. eds. Protein tailoring for food and medical uses. New York, Marcel Dekker, Inc. 1986, p. 75-96.
- ADLER-NISSEN, J.; ERIKSEN, S.; OLSEN, H.S. Improvement of the functionality of vegetable proteins by controlled enzymatic hydrolysis. Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr. 32: 411-423, 1983.
- ADLER-NISSEN, J. & OLSEN, H.S. The influence of peptide length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. ACS Symposium Series 92:125-146, 1979.
- AHRENS, R.A.; WILSON, J.E.Jr.; WOMACK, M. Utilization of calories and nitrogen by rats fed diets containing purified casein versus a mixture of amino acids semulating casein. J. Nutr. 88: 219-224, 1966.
- AKESON, W.R. & STAHNMANN, M.A. A pepsin-pancreatin digest index of protein quality evaluation. J. Nutr. 83: 257-261, 1964.
- ALLRED, M.C. & MAC DONALD, J.L. Determination of sulfur amino acids and tryptofan in foods feeds ingredients: collaborative studies. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71(3): 603-606, 1988.

- ALTMAN, G.G. Influence of starvation and refeeding on mucosal size and epithelial renewal in the rat small intestine. Am. J. Anat. 133: 391-400, 1972.
- AMBLER, R.F. Enzymic hydrolysis with carboxipeptidases. Methods in Enzymology. 11: 155-156, 1967.
- ANDERSON, H.L.; HEINDEL, M.B.; LINKSWILLER, H. Effect of nitrogen balance of adult man of varying source of nitrogen and level of caloric intake. J. Nutr. 99: 82-90, 1969.
- ANDERSON, P.A. Interactions between proteins and constituents that effect protein quality. In: FINLEY, J.W. & HOPKINS, D.T. eds. Digestibility and aminoacid availability in cereal and oilseeds. St. Paul, Minnesota, AACC, 1985, p. 31-45.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). Official Methods of Analysis. 11th ed. Washington, DC., Ed. W. Horwitz, 1975, pg. 857.
- ARAI, S.; YAMASHITA, M.; KATO, H.; FUJIMAKI, M. Applying proteolytic enzymes on soybean. Part V. A nondialysable bitter peptide in peptic hydrolysate of soybean protein and its bitterness in relation to the chemical structure. Agric. Biol. Chem. 34: 729-738, 1979a.
- ARAI, S.; NOGUCHI, M.; KUROSAWA, S.; KATO, H.; FUJIMAKI, M. Applying proteolytic enzymes on soybean. 6. Deodorization effect of aspergillopeptidase A and debittering effect of aspergillus acid carboxypeptidase. J. Food Sci. 35: 392-395, 1970b.
- ARCHER, M.C.; RAGNARSSON, I.O.; TANNENBAUM, S.R.; WANG, D.I.C. Enzymatic solubilization of an insoluble substrate, fish protein concentrate: Process and Kinetic consideration. Biotechnol. Bioeng. XV: 181-196, 1973.
- BALLESTER, D.; YANEZ, E.; BRUNSER, O.; STEKEL, A.; CHADUD, P.; CASTANO; MONCKBERG, F. Safety evaluation of an enzymatic fish protein hydrolysate: 10-month feeding study and reproduction performance in rats. J. Food Sci. 42: 407-409, 1977.

- BEHMER, D.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. In: Manual de Técnicas para Histologia normal e patológica. São Paulo, EDUSP, 1976. p. 31, 173, 181.
- BECKMAN INSTRUMENTS, INC. Beckman 118/119 CL Amino acid analysis instruction manual. Palo Alto, 1977.
- BEER, W.H.; MURRAY, E.; OH, S.; PEDERSEN, H.E.; WOLFE, R.R.; YOUNG, V. A long term metabolic study to assess the nutritional value of and immunological tolerance to two soy-protein concentrates in adult humans. Am. J. Clin. Nutr. 50: 997-1007, 1989.
- BHUMIRATANA, C.G. & AMU, C.H. Enzymatic solubilization of fish protein concentrate in membrane reactors. J. Food Sci. 42: 1016-1021, 1977.
- BODWELL, C.E. & MARABLE, I.N.L. Effectiveness of methods for evaluating the nutritional quality of soybean protein. J. Am. Oil Chem. Soc. 58: 475-483, 1981.
- BODWELL, C.E.; SATERLLE, L.D.; HACLER, L.R. Protein digestibility of the same protein preparations by human and rat assays and by in vitro enzymatic digestion methods. Am J. Clin. Nutr. 33: 677-686, 1980.
- BOYER, R.A. Early history of the plant protein industry. Cereal Food World 21: 297-298, 1976.
- BRADY, M.S.; RICHARD, K.A.; FITZGERALD, J.F.; LEMONS, J.A. Specialised formulas and feeding for infants with malabsorption or formula intolerance. J. Am. Diet. Assoc. 86(2):191-205, 1986.
- BRANTL, V.; TESCHEMACHER, H.; HENSCHEN, A.; LOTTSPEICH, F. Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360: 1221-1216, 1979.

- BRITTON, J.R. & KOLDOVSKY, O. Development of luminal protein digestion: implications for biologically active dietary polypeptides. J. Pediat. Gastroenterol. Nutr. 9: 144-162, 1989.
- BROOKS, J.R.; MORR, C.V. Phosphorus and phytate content of soybean proteins components. J. Agric. Food Chem. 32: 672-676, 1984.
- BROOKS, J.R.; MORR, C.V. Effect of phytate removal treatments upon molecular weight and subunit composition of major soy protein fraction. J. Agric. Food Chem. 33: 1128-1142, 1985.
- BROWN, H.O.; LEVINE, M.L.; LIPKIN, M. Inhibition of intestinal epithelial cell renewal and migration induced by starvation. Am. J. Physiol. 205: 868-872, 1963.
- BROWN, R.O.; SCHELGEL, K.; HALL, N.H. Taste preference for nutritional supplements: Comparison of cancer patients and healthy controls using a wine-tasting scale. J. Parent. Enteral Nutr. 10: 490-493, 1986.
- CARR, J.H.; LOUGHHEED, T.C.; BAKER, B.E. Studies of protein hydrolysis IV- Further observations of the taste of enzymic protein hydrolysates. J. Sci. Food Agric. 7: 629-637, 1956.
- CHEETAM, P.S.J. The applications of enzymes in industry. In: WISEMAN, A.D. ed. Handbook of enzyme biotechnology. 2nd ed. Chichester, Ellis Horwood Ltd, 1985, p. 274-373.
- CHEFTEL, C.; AHERN, M.; WANE, D.I.C.; TANNENBAUM, S.R. Enzymatic solubilization of fish protein concentrate: Batch studies applicable to continuous enzyme recycling process. J. Agric. Food Chem. 19: 155-161, 1971.
- CHEN, B.H-Y & MORR, C.V. Solubility and foaming properties of phytate-reduced soy protein isolate. J. of Food Sci. 33: 1128-1132, 1985.

- CHEN, M.L.; ROGERS, Q.R.; HARPER, A.E. Observations of protein digestion "in vivo". IV: Further observation of the gastrointestinal contents of rats fed different dietary proteins. J. Nutr. 76: 235-241, 1962.
- CHERNOFF, R. Nutritional support: formulas and delivery of enteral feeding. J. Am. Diet. Assoc. 79(10):426-432, 1981.
- CHERYAN, M. Phytic acid interactions in food systems. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 13: 297-335, 1980.
- CHERYAN, M. & DEESLIE, W.D. Soy protein hydrolysis in membrane reactors. J. Am. Oil Chem. Soc. 60: 1112-1115, 1983.
- CHOBERT, J.M.; SITOBY, M.Z.; WHITAKER, J.R. Solubility and emulsifying properties of casein modified enzymatically by *Staphylococcus aureus* V8 protease. J. Agric. Food Chem. 36: 220-224, 1988a.
- CHOBERT, J.M.; BERTRAND-HARB, C.; NICOLAS, M.G. Solubility and emulsifying properties of casein and whey proteins modified enzymatically by trypsin. J. Agric. Food Chem. 36: 883-888, 1988b.
- CHOPRA, J.G. Regulatory status of medical foods. In: Defined medical diets. SHILS, M. ed., 1977, p. 149.
- CHURELLA, H.R.; CO YAO, B.; THOMSON, W.A.B. Soybean trypsin inhibitor activity of soy infant formulas and its nutritional significance for the rat. J. Agric. Food Chem. 24: 393-397, 1976.
- CHURELLA, H.R. & VIVIAN, V.M. Effect of phytic acid level in soy protein based infants formulae on mineral availability in the rats. J. Agric. Food Chem. 37: 1352-1357, 1989.
- CLEGG, M.K. & McMILLAN, A.D. Dietary enzymic hydrolysates of protein with reduced bitterness. J. Food Technol. 9: 21-29, 1974.

- CLEGG, M.K.; SMITH, G.; WALKER, A.L. Production of an enzymatic hydrolysate of casein on a kilogram scale. J. Food Technol. 9: 425-431, 1974.
- CLIFFORD, W. LO. & WALKER, W.A. Changes in gastrointestinal tract during enteral or parenteral feeding. Nutr. Reviews. 47(7): 193-198, 1989.
- CNNPA. (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos). Resolução nº 24/76. In: Coletânea-da-ABIA. Revisão 3. s.d. p. 7.9 76.
- COCKRAN, W. G. & COX, G.M. Experimental design. 2 ed. New York, Wiley, 1957, 611p.
- CONSTANTINIDES, A.; ADU-AMANKWA. Enzymatic modification of vegetable proteins: mechanisms, kinetics, and production of soluble and partially soluble protein in batch reactor. Biotechnol. Bioeng. XXIII: 1543-1565, 1980.
- COWAN, D. Proteins. In: GODFREY, T. & REICHEL, J. eds. Industrial enzymology the application of enzymes in industry. Londres, MacMillan, 1983, p. 352-374.
- CROMPTON, R.F.; GANGOLLI, S.D.; SIMSON, P.; MATTHEWS, D.M. Rate of absorption by rat intestine of pancreatic hydrolysate of protein and their corresponding aminoacid mixtures. Clin. Sci 41:409-417, 1971.
- DE RHAM, O. & JOST, T. Phytate-protein interactions in soybean extracts and low phytate soy proteins products. J. Food Sci. 44: 596-600, 1979.
- DECKER, C.D. & KOLAR, C.W. Utilization of soy protein in meat and fish applications. In: Developments in Food Science (2). Proceedings of the fifth International Congress of Food Science and Technology. CHIBA, H.; FUJIMAKI, M.; KWAI, K.; MATSUDA, H.; MORITA, Y. eds., 1979, p.79-84.

- DEESLIE, W.D. & CHERYAN, M. A CSTR-Hollow fiber system for continuous hydrolysis of proteins. Performance and kinetics. Biotechnol. Bioeng. 23: 2257-2271, 1981a.
- DEESLIE, W.D. & CHERYAN, M. Continuous enzymatic modification of proteins in a ultrafiltration reactor. J. Food Sci. 46: 1035-1042, 1981b.
- DEESLIE, W.D. & CERYAN, M. Functional properties of soy protein hydrolysis from a continuous ultrafiltratin reactor. J. Agric. Food Chem. 36: 26-31, 1988.
- DE RHAM, D. & JOST, T. Phytate-protein interaction in soybean extracts and low phytate soy protein products. J. Food Sci. 44: 596-600, 1979.
- DETERMANN, H. Gel Chromatography.: a laboratory handbook. 2.ed. Springer Velag, New York, 1969,p.69.
- DINAL. Portaria n 08/MS de 26 de junho de 1989.
- DUTRA DE OLIVEIRA, J.E. & SANTOS, J.E. Soybean products for freding infants, children and adults under nutritional stress. J. Am. Oil Chem. Soc. 58: 366-370, 1981.
- ELDRIDGE, A.C.; BLACK,L.T.; WOLF,W.J. Carbohydrate composition of soybean flours, protein concentrate, amd isolate. J. Agric. Food Chem. 27: 799-802, 1979.
- FAIRCLOUCH, P.D.; HEEARTY; J.E.; SILK, D.B.A.; CLARK, M.L. Comparision of the absorption of two protein hydrolysates and their effect and their effects on water and electrolyte movements in the human jejunum. Gut 21: 829-834, 1980.
- FEDERAL REGISTER. Code of Federal Regulations. Food and Drugs. vol. 21, 1988.

- FINOT, P.A. Influence of processing on the nutritional value of proteins. Qual. Plant. Foods Hum. Nutr. 32: 438-453, 1983.
- FOMAN, S.J.; ZIEGLER, E.E.; FILER, L.J.; NELSON, S.E.; EDWARDS, B.B. Methionine fortification of soy protein fed to infants. Am J. Clin. Nutr. 32: 1460-1471, 1979.
- FOMAN, S.J.; ZIEGLER, E.E.; NELSON, S.E.; EDWARDS, B.B. requirements of sulphur-containing aminoacids in Infancy. J. Nutr 116: 1405-1422, 1986.
- FOX, K.K. Casein and whey products. In: WEBB, B. & WHITTIER, F., eds. By products from milk. Westport, Connecticut, AVI, 1970, p. 331.
- FREITAS, O. Produção e caracterização de hidrolisados enzimáticos de caseína para usos terapêuticos específicos. Ribeirão Preto, SP. Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1991, 129p. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.
- FREITAS, O; LAMOUNIER, J.A.; DUTRA DE OLIVEIRA, J.E.; DOS SANTOS, J.E.; GREENE, L.J. Methodology for characterizing protein hydrolysates. Arg. Biol. Technol. 27: 251, 1984.
- FREEMAN, H.J.; KIM, Y.S.; SLEISENGER, M.H. Protein digestion and absorption in man. Am. J. Med. 67: 1030-1038, 1979.
- FUJIMAKI, M.; KATO, H.; ARAI, S.; TAMAKI, E. Applying proteolytic enzymes on soybean. 1. Proteolytic enzyme treatment of soybean protein and its effect on the flavor. Food Technol. 22: 889-893, 1968.
- FUJIMAKI, M. & YAMASHITA, M. Enzymatic protein degradation and resynthesis for protein improvement. Food Protein, Adv. Chem. Series 160: 156-184, 1977.
- FUJIMAKI, M.; YAMASHITA, M.; ARAI, S.; KATO, H. Plastein reaction. Its application to debittering of proteolysates. Agric. Biol. Chem. 34: 483-484, 1970.

- GALEAZZI, M.A.M. Nutritional changes of soybean protein by different storage conditions: approach for invitroevaluations. Report of United Nations University, National Research Institute, Japan, 1981.
- GHAUTIER, S.F.; VACHON, C.; SAVOIE, L. Enzymatic conditions of an *in vitro* method to study protein digestion. J. Food Sci. 51: 960-964, 1986.
- GODFREY, T. Comparison of key characteristics of industrial enzymes by type and source. In: GODFREY, T. & REICHEL, J. eds. Industrial enzymology. The application of enzymes in industry. Londres, Mac Millan, 1983, p. 221-259.
- GOROSTIZA, E.; POUILLAIN, M.G.; MARCHE, C.; GOBERT, J.G.; BROYART, J.P.; MACRY, J.; CEZARD, J.P. Effet du jeûne et de la réalimentation sur l'adaptation de l'intestin grêle chez le rat. Un modele d'études physio-pathologiques. Gastroenterol. Clin. Biol. 790-796, 1985.
- GREENBERG, N.A. & SHIPE, W.F. Comparison of the abilities of trichloroacetic, picric, sulfosalicylic, and tungstic acids to precipitate protein hydrolysates and proteins. J. Food Sci. 44: 735-137, 1979.
- GREENSTEIN, J.P.; BIRNBAUM, S.M.; WINITZ, M.; OTEY, M.C. Quantitative nutritional studies with water-soluble, chemical defined diets. I: Growth, reproduction and lactation in rats. Arch. Biochem. Biophys. 72: 396-416, 1957.
- GRIMBLE, G.C.; REES, R.G.; KEOHANE, P.P.; CARTWRIGHT, T.; DESMEUMAX, M.; SILK, D.B.A. Effect of peptide length on adsorption of egg protein hydrolysates in normal human jejunum. Gastroenterol. 92: 136-142, 1987.
- GUMBANN, M.R.; DUGAN, G.M.; SPANGLER, W.L.; BAKER, E.C.; RACKIS, J.J. Pancreatic response in rats and mice to trypsin inhibitors from soy and potatoes after short- and long-term dietary exposure. J. Nutr. 119: 1598-1609, 1989.

- HAGGETT, T.O. Hydrolyses of lactic casein by proteolytic enzymes. In: Proc. 19th Int. Dairy Congr., Part IE, International Dairy Congress, Melbourne, Australia, 1974, p. 339.
- HARDWICK, J.E. & GLATZ, C.E. Enzymatic hydrolysis of corn gluten meal. J. Agric. Food Chem. 37: 1188-1192, 1989.
- HARRAH; J.D.; STEPHENS, N.D.; HAWES, M.C. Prospective sensory evaluation of preparatory methods of elemental diets. J. Paren. Entel. Nutr. 4: 303-306, 1980.
- HEGARTY, J.E.; FAIRCLOUCH, P.D.; MORIARTY; K.J.; CLARK, M.L.; KELLY, M.J.; DAWSON, A.M. Comparison of plasma and intraluminal amino acid profiles in man after meals containing a protein hydrolysate and equivalent amino acid mixture. Gut 23: 670-674, 1982.
- HELBIG, N.B.; HO, L.; CHRISTY, G.E.; NAKAI, S. Debittering of skim milk hydrolysates by adsorption for incorporation into acidic beverages. J. Food Sci. 45: 331-335, 1980.
- HERNANDEZ, R. & ASENJO, J.A. Production and characterization of an enzymatic hydrolysate of skim milk lactose and proteins. J. Food Sci. 47: 1895-1898, 1911, 1982.
- HEVIA, P. & OLCOTT, H.S. Flavor of enzyme-solubilized fish protein concentrate fractions. J. Agric. Food Chem. 25: 772-775, 1977.
- HIRS, C.H.W. Detection of peptides by chemical methods. Methods in Enzimology. 11: 325-329, 1967.
- HSU, H.W.; VAVAK, D.L.; SATTERLEE, L.D.; MILLER, G.A. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. J. Food Sci. 42: 1269-1273, 1977.
- HUNG, N.D.; cSEKE, M.; SZALBOLCSI, G. Processed protein foods characterized by *in vitro* digestion rates. J. Food Sci. 49: 1543-1545, 1551, 1984.

- IACOBUCCI, G.A.; MEYERS, M.J.; EMI, S.; MYERS, D.V. Large scale continuous production of soybean protein hydrolysate in a constant flux membrane reactor. Proc. IV Int. Congr. Food Sci. Technol., Madrid. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Valencia. Vol V, p. 83-95, 1974.
- IMONDI, A.R. & STRADLEY, R.P. Utilization of enzymatically hydrolyzed soybean protein and crystalline amino acid diets by rats with exocrine pancreatic insufficiency. J. Nutr. 104: 793-801, 1974.
- INAGAWA, J.; KIYOSAWA, I.; NAGASAWA, T. Effects of phytic acid on the digestion of casein and soybean protein with trypsin, pancreatin or pepsin. J. Japanese Soc. Nutr. Food Sci. 40 (5): 367-373, 1987.
- INOUE, G.; TAKAHASHI, T.; KISHI, K.; KUMATSU, T.; NJIYAMA, Y. The evaluation of soy protein alone and combination with fish protein in adult Japanese men. In: TORUN, B.; YOUNG, V.B.; RAND, M. eds. Protein energy requirements of developing countries: evaluation of new data. United Nations University World Hunger Programme, Food and Nutrition Bulletin Supplement 5. United Nations University, Tokyo, 1981. p. 77-87.
- ISTFAN, N.; MURRAY, E.; MORTEZA, J.; YOUNG, V.R. An evaluation of the nutritional value of a soy protein concentrate in young adult men using the short-term -N- balance method. J. Nutr. 113: 2516-2523, 1983a.
- ISTFAN, N.; MURRAY, E.; JANGHORBANI, M.; EVANS, W.J.; YOUNG, V.R. The nutritional value of soy protein concentrate (STAPRO-3200) for long-term protein nutritional maintenance in young men. J. Nutr. 113: 2524-2534, 1983b.
- ITOH, H.; KISHI, T.; CHIBATA, I. Comparative effects of casein and amino acid mixture simulating casein on growth and food intake in rats. J. Nutr. 103: 1709-1715, 1973.

- ITOH, H.; KISHI, T.; CHIBATA, I. Effect of casein and a corresponding amino acid mixture on rat repletion after protein depletion. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 20: 401-406, 1974.
- JOHNSON, V.L. Proteins in cosmetic and toiletries. Drug and Cosmetic Ind. 126(6):36-40, 1980.
- JONES, B.J.M.; LEES, R.; ANDREWS, J.; FROST, F.; SILK, D.B.A. Comparison of an elemental and polymeric enteral diet in patients with normal gastrointestinal. Gut 24: 78-84, 1983.
- JOST, R. & MONTI, J.C. Partial enzymatic hydrolysis of whey protein by trypsin. Dairy Sci. 60:1387-1393, 1977.
- JOST, R. & MONTI, J.C. Emulgateurs peptidiques obtenus par l'hydrolyse enzymatique partielle de la protéine serique du lait. Le lait 62: 521-524, 1982.
- KAAPOR, A.C. & GUPTA, Y.P. Biological evaluation of soybean protein and effect of amino acid supplementation. J. Food Sci. 40: 1162-1164, 1975.
- KAKADE, M.L.; SEMON, N.; LIENER, I.E. An evaluation of natural vs synthetic substrates for measuring the antitryptic activities of soybean samples. Cereal Chem. 46: 518-526, 1969.
- KALIZS, H.M. Microbial proteinases. Adv. Biochem. Engen. Biotechnol. 36: 1-65, 1988.
- KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R.C.; SILK, D.B. A. Influence of protein composition method on intestinal absorption of protein in man. Gut 26: 907-913, 1985.
- KIES, C. Bioavailability: a factor in protein quality. J. Agric. Food Chem. 29: 435-440, 1981.
- KILARA, A. Enzyme-modified protein food ingredients. Process Biochem. 23(10): 149-157, 1985.

- KIM, S.Y.; PARK, P.S.W.; RHEE, K.C. Functional properties of proteolytic modified soy protein isolate. J. Agric. Food Chem. 38: 651-656, 1990.
- KIMBALL, M.E.; HSIEH, D.S.T.; RHA, C.K. Chymotripsyn hydrolysis of soy protein. J. Agric. Food Chem. 29: 872-874, 1981.
- KINSELLA, J.E. Functional properties of proteins in foods: A survey. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 7(3): 219-280, 1976.
- KINSELLA, J.E. Functional properties of soy proteins. J. Am. Oil Chem. Soc. 56: 242-258, 1979.
- KINSELLA, J.E.; GERMAN, B.; DAMODARAN, S. Psysicochemical and function properties of oilseed proteins with emphasis on soy proteins. In: New Proteins Foods, Academic Press, New York, 1985. vol. 5.
- KISHI, T.; IWASAWA, Y.; ITOH, H.; CHIBATA, I. Effect of nitrogen source on nutritional management after small bowel resection in rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 24: 167-176, 1978.
- KNIGHTS, R.J. Processing and evaluation of the antigenicity of proteins hydrolysates. In: LIFSHITZ, F. ed. Nutrition for Special need in Infancy, New York, Marcell-Dekker, 1985. p. 105-118.
- KORETZ, R.L. & MEYER, J.H. Elemental diets- Facts and fantasies. Gastroenterol. 78: 393-410, 1980.
- KOTLER, D.P.; KRAL, J.G.; BJORNTORP, P. Refeeding after a fast in rats: effects on small intestine enzymes. Am. J. Clin. Nutr. 36: 457-462, 1982
- KUEHLER, C.A.; STINE, C.M. Effect of enzymatic hydrolysis on some functional properties of whey proteins. J. Food Sci. 39: 379-382, 1974.
- LALASIDES, G. Four new methods of debittering protein hydrolysates and a fraction of hydrolysates with high content of essential amino acids. Ann. Nutr. Alim. 32: 709-723, 1978.

- LALASIDES, B.; BOSTROM, S.; SJOBERG, L.B. Low molecular weight enzymatic fish protein hydrolysates chemical composition and nutritive value. J. Agric. Food Chem. 26: 751-756, 1978.
- LALASIDES, B. & SJOBERG, L.B. Two methods of debittering protein hydrolysates and a fraction of hydrolysates with exceptionally content of essential aminoacids. J. Agric. Food Chem. 26: 742-749, 1978.
- LAMDUNIER, J.A. Caracterização bioquímica e nutricional de um hidrolisado de farinha de carne para uso em nutrição enteral. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas, 1984. 104p. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais.
- LATTA, M. & ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. J. Agric. Food Chem. 28: 1313-1315, 1980.
- LAWHON, J.T.; RHEE, R.C.; LUSAS, E.W. Soy protein ingredients prepared by new process - aqueous processing and industrial membrane isolation. J. Am. Oil Chem. Soc. 58: 377-384, 1981.
- LEE, S.W.; SHIMUZU, M.; KAMINOAWA, S.; YAMAUCHI, K. Emulsifying properties of peptides obtained from hydrolysates of beta-casein. Agri. Biol. Chem. 51 (1): 161-167, 1987.
- LIENER, I. Significance for humans of biologically active factors in soybeans and other food legumes. J. Am. Oil Chemist's Soc. 56: 121-129, 1979.
- LIENER, I.E. Factors affecting the nutritional quality of soya products. J. Am. Oil Chem. Soc. 58: 406-415, 1981.
- LIENER, I.E. Trypsin inhibitors: concern for human nutrition or not? J. Nutr. 116: 920-923, 1986.
- LIENER, I.E.; BOUDALE, R.L.; DESHMUKH, A.; SATTERBERG, T.L.; WARD, G.; DIPIETRO, C.M.; BANKEY, P.E.; BORNER, J.W. Effect of trypsin inhibitor from soybeans (Bowman-Birk) on the secretory activity of the human pancreas. Gastroenterol. 94: 419-427, 1988.

- LILLFORD, P.J. & WRIGHT, D.J. Influence of isoelectric precipitation on the solubility of soybean proteins. J. Sci. Food Agric. 32: 315-327, 1981.
- LIS, M.T.; MATTHEWS, D.M.; CRAMPTON, R.F. Effects of dietary restriction and protein deprivation of protein digestion products in the rat. Br. J. Nutr. 28: 443-446, 1972.
- LYNCH, C.L.; RHA, C.K.; CATSIMPOOLAS, N. Tryptic hydrolysis of glycinin and its subunits. J. Sci. Food Agric. 28: 971-979, 1977.
- MA, C.Y.; AMANTEA, G.F.; NAKAI, S. Production of nonbitter, desalted milk hydrolysate fortification of soft drinks and fruit juices. J. Food Sci. 30: 1017-1020, 1983.
- MARABLE, N.I. & SANZONE, G. In vitro assays of protein quality- Assaysutilizing enzymatic hydrolysis. In: BODWELL, C.E.; ADKINS, J.S.; HOPKINS, D.T. eds. Protein Quality in Humans: Assessment and in vitro methods., Westport,CT, AVI Publishing Co.,1981. p.275.
- MARCHINI, J.S.; FREITAS, O.; DUTRA DE OLIVEIRA, J.E. Avaliação bioquímica e nutricional de dois hidrolisados enzimáticos de proteína de soja. Ciênc. Tecnol. Aliment. 5(1): 12-21, 1985.
- MARCHINI, J.S.; VANNUCCHI, H.; GOMES, M.E. DOS SANTOS, J.E.; DUTRA DE OLIVEIRA, J.E. Uso de nutrição enteral quimicamente definida em pacientes do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Rev. Paulista de Medicina 97:148-152, 1981.
- MATOBA, T. & HATA, T. Relationship between bitterness of peptides and their chemical structures. Agric. Biol. Chem. 36: 1423-1431, 1972.
- MATTHEWS, D.M. Intestinal Absorption. Physiol.Rev 55:537-608, 1975.
- MATTHEWS, D.M. & ADIBI, S.A. Peptide absorption. Gastroenterol. 71: 151-161, 1976.

- MAUBOIS, J.L. & LEONIL, J. Peptides du lait à activité biologique. Lait 69: 245-269, 1989.
- MEGUID, M.M.; DEBONIS, D.; TERZ, J.J. Nutritional support in cancer. Lancet 2: 230-236, 1983.
- MEGUID, M.M.; LANDEL, A.M.; TERZ, J.J.; AKRABAWI, S.S. Effect of elemental diet on albumin and urea synthesis: Comparison with partially hydrolysed protein diet. J. Sur. Res. 37(1): 16-24, 1984.
- MEISEL, H. & SCHILIMME, E. Milk proteins: precursors of bioactive peptides. Trends Food Sci. Technol. 2(8): 41-43, 1990.
- METTA, V.C. FEITH, J.A.; JOHNSON, B.C. Energy requirements of the adult rat fed an amino acid diet. J. Nutr. 71: 332-336, 1960.
- MIETSCH F.; FEHER, J.; HALAZ, A. Investigation of functional properties of partially hydrolysed proteins. Die Nahrung 33(1): 9-15, 1989.
- MINAGAWA, E.; KAMINOGAWA, S.; TSUKASAKI, F.; YAMAUCHI, K. Debbitering mechanism in bitter peptides of enzymatic hydrolysates from milk casein by aminopeptidase T. J. Food Sci. 54: 1225-1229, 1989.
- MONTGOMERY, R.D. Ghanges in basal metabolic rate of the malnourished infants and their relation to body composition. J. Clin. Invest. 41: 1653-1663, 1962.
- MONTI, J.C. & JOST, R. Enzymatic solubilization of heat denatured cheese whey protein. J. Dairy Sci. 1305-1309, 1978a.
- MONTI, J.C. & JOST, R. Solubilization of cheese whey protein by trypsin and a process to recover the active enzyme from the digest. Biothecnol. Bioengin. 20: 1173-1185, 1978b.

- MORIARTY, K.J.; HEGARTY, J.E.; FAIRCLOUGH, P.D.; KELLY, M.J.; CLARK, M.L.; DAWSON, A.M. Relative nutritional value of whole protein, hydrolysed protein and free amino acid in man. Gut **26**: 694-699, 1985.
- MOSSOR, P.A.; SKUPIN, J.; ROMANOWSKA, B. Plant inhibitors of proteolytic enzymes. Nahrung **28**: 93-112, 1984.
- MOZERSKY, S.M. & PANETTIERI, R.A. Is pH drop a valid measure of extend of protein hydrolysis? J. Agric. Food Chem. **31**: 1313-1316, 1983.
- MYERS, D.V.; RICKS, E.; MYERS M.J.; WILKINSON, M.; IACOBUCCI, G.A. Chemical and nutritional evaluation of enzymatic soybean hidrolysates. Proc. IV Int. Conr. Food Sci. Technol., Madrid. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Valencia. Vol V, p. 96-102, 1974.
- NAKAGAWA, J. & MASSAMA, Y. Effect of protein nutrition and life span in the rat. J. Nutr. **101**: 613-620, 1971.
- NAKHOST, Z. HSIEH, D.S.T.; SHIH, V.; RHA, C.K. Synthesis of low-phenylalanine polypeptides. int. J. Pept. Prot. Res. **20**: 267-275, 1982.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, COMMITTEE ON DIETARY ALLOWANCES. Recommended Dietary Allowances. 9th Revised ed. National Academy of Sciences, Washington, DC., pg. 39-54, 1980.
- NAVARRETE, D.A.; ELIAS, L.G.; BRAHAM, J.E.; BRESSANI, R. The evaluation of the protein quality of soybean products by short-term bioassays in adult human subjects. Arch. Lationam. Nutr. **29**: 386-401, 1979.
- NITSAN, Z. & LIENER, I.E. Studies of the digestibility and retention of nitrogen and amino acids in rats fed raw of heated soy flour. J. Nutr. **106**: 292-299, 1976.
- NUTRITIONAL BIOCHEMICALS CORPORATION, INC. Diet Catalogue. NBC, Cleveland, Ohio, 1977/1978. p. 18-24.

- OHREN, J.A. Process and product characteristics for soya concentrates and isolates. J. Am. Oil Chem. Soc. 58: 333-335, 1981.
- OKUBO, K.; MYERS, D.V.; IACOBUCCI, G.A. Binding of phytic acid to glycinin. Cereal Chem. 53: 513-524, 1976.
- OKUBO, K.; WALDROP, A.; IACOBUCCI, G.; MYRES, D. Preparation of low phytate soybean isolated and concentrated by ultrafiltration. Cereal Chem. 52(2): 263-271, 1975.
- OLSEN, H.S. & ADLER-NISSEN, J. Industrial production and applications of a soluble enzymatic hydrolysate of soya protein. Process Biochem. 17(7): 6-11, 1979.
- OLSMAN, H. Hydrolysed and autolysed vegetable proteins as functional food ingredients. J. Am. Oil Chem. Soc. 56: 375-376, 1979.
- O'MEARA, G.M. & MUNRO, P.A. Kinetics of the hydrolysis of lean meat protein by alcalase derivation of two alternative rate equations and their fit to experimental data. Biotechnol. Bioeng. 27: 861-869, 1985.
- OVESEN, L. & ALLINGSTRUP, L. Different quantities of two commercial liquid diets consumed by weight-losing patients. J. Parenter. Enter. Nutr. 16: 275-278, 1992
- PATEL, D; ANDERSON, G.H.; JEEJEEEBHOY, K.N. Amino acid adequacy for parenteral casein hydrolysate and oral cottage cheese in patients with gastrointestinal disease, as measured by nitrogen balance and blood aminogram. Gastroenterol. 65: 427-432, 1973.
- PELLET, P.L. & YOUNG, U.R., eds. Nutritional evaluation of proteins foods, United Nations University, Tokyo, 1980, 154p.

- POULLAIN, M.G.; CEZARD, J.P.; ROGER, L.; MENDY, F. Effect of whey proteins, their oligopeptide hydrolysate and free amino acid mixture on growth and nitrogen retention in fed and starved rats. J. Parenter. Enter. Nutr. 13: 382-386, 1989.
- PRADO, V.C.; ANTUNES, F.L.; SGARBIERI, V.C. Antinutritional occurrence and some physicochemical properties of the protein fractions of five soybean varieties. Arch. Latinoam. Nutr. 30:551-563, 1980.
- PRATTLEY, C.A.; STANLEY, D.W.; SMITH, T.K.; VAN DE VOORT, F.R. Protein phytate interaction in soybeans III. The effect of protein-phytate complexes on zinc bioavailability. J. Food Biochem. 6: 273-282, 1982.
- PUSKI, G. Modification of functional properties of soy proteins by proteolytic enzymes treatment. Cereal Chem. 52(5): 655-664, 1975.
- RACKIS, J.J. & ANDERSON, R.L. Mineral availability in soy protein products. Food Prod. Dev. 11: 38-44, 1977.
- RACKIS, J.J.; MCGHEE, J.E.; BOOT, H.A.N. Biological treshold levels of soybean inhibitors by rat bioassay. Cereal Chem. 52(1): 85-92, 1975.
- RAMA-RHO, P.B.; METTA, V.C.; JOHNSON, B.C. The amino acid composition and the nutritive value of proteins. II. Amino acid mixture as a dietary source of nitrogen for growth. J. Nutr. 71: 327-331, 1960.
- RAND, W.M.; SCRIMSHAW, N.S.; YOUNG, V.R. Conventional ("long term") nitrogen balance studies for protein quality evaluation in adults: Rationale and limitations. In: BODWELL, C.E.; ADKINS, J.S.; HOPKINS, D.T., eds. Protein quality in humans: assessment and in estimation. AVI, Westport, 1981. p. 61-94.
- REDDY, N.R.; SATHE, S.K.; SALUNKHE, D.E. Phytates in legumes and cereals. Adv. Food Res. 28: 1-92, 1982.

- RITTER, M.A.; MORR, C.V.; THOMAS, R.L. In-vitro digestibility of phytate-reduced and phenolic-reduced soy proteins isolates. J. Food Sci. 52: 325-327, 1987.
- ROGER, L.; BRULE, G.; MAUBOIS, J.L. Nouvelles voies de valorization des protéines lactosériques. I. Hydrolyse des protéines de lactosérum intérêt thérapeutique. Techn. Laitière. 60: 65-67, 1977.
- ROGERS, G.R. & HARPER, A.E. Aminoacid diet and maximal growth in rat. J. Nutr. 87: 267-273, 1965.
- ROOZEN, J.F. & PILNIK, W. Ultrafiltration controlled enzymatic degradation of soy protein. Process Biochem. 11(7): 24-25, 1975.
- ROTHENBUHLER, E.; WAIBEL, R.; SOLMS, J. An improved method for the separation of peptides and alfa-aminoacids on copper-Sephadex. Anal. Biochem. 97: 367-375, 1979.
- RUIZ, W.A. Proteólise do resíduo do extrato hidrossolúvel de soja. Campinas, SP. Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1985, 199p. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas.
- SAINT-PAUL, F.; HUMBERT, G.; PAQUET, O.; LINDEN, B. Hydrolyse enzymatique de protéines laitières industrielles: Incidences sur leur solubilité. Sci. Aliments. 4: 259-264, 1984.
- SAIO, K.; KOYAMA, E.; WATANABE, T. Protein-calcium-phytic acid relationship in soybean. Part II. Effects of phytic acid on combination of calcium with soybean meal protein. Agric. Biol. Chem. 32: 448-452, 1968.
- SALUNKE, D.K. & BOLIN, H.R. Deydrate protein fortified fruit juices. Food Product Devel. 6(1): 84-85, 1972.
- SARWAR, G.; PEACE, R.W.; BOTTING, H.E. Differences in protein digestibility and quality of liquid concentrate and powder formulation of milk based infant formulas fed to rats. Am. J. Clin. Nutr. 49: 806-813, 1989.

- SATERLEE, L.D. & ABDUL-KADIR, R. Effect of phytate content on protein quality of soy and wheat bran proteins. Lebensm. -Wiss. u. Technol. 16: 8-14, 1983.
- SAUBERLICH, H.E. Growth of rats fed protein free-diets supplemented with purified amino acids mixtures. J. Nutr. 74: 298-306, 1961.
- SCHMIDL, M.K.; MASSARO, S.S.; LABUZA, T.P. Parenteral and enteral foods systems. Food Technol. 42 (7): 77-87, 1988.
- SCRIMSHAW, N.S.; WAYLER, A.H.; MURRAY, E.; STEINKE, F.H.; RAND, W.M. Nitrogen balance response in young men given one of two isolated soy protein or milk proteins. J. Nutr. 113: 2492-2497, 1983.
- SCRIMSHAW, N.S. & YOUNG, V.R. soy protein in adult human nutrition: a review with new data. In: WILCKE, H.L.; HOPKINS, D.T.; WAGGLE, D.H. eds. Soy Protein and Human Nutrition. Academic Press, New York, 1979. P. 121-148.
- SERRANIO, M.R.; THOMPSON, L.U.; SAVOIE, L.; PARENT, B. Effect of phytic acid on the *in vitro* rate of digestibility of papeseed proteins aminoacids. J. Food Sci. 50: 1689-1772, 1985.
- SHIOYA, Y.; YOSHIDA, H.; NAKAJIMA, T. Estimation of molecular weights of peptides by determination of height equivalent to a theoretical plate in size-exclusion chromatography. J. Chromatr. 240: 341-348, 1982.
- SILK, D.B.A.; CLARK, M.L.; MARRS, T.C.; ADDISON, J.M.; BURSTON, D.; CLEGG, M. Jejunal absorption of an amino acid mixture simulating casein and an enzymic hydrolysate of casein prepared for oral administration to normal adults. Br. J. Nutr. 33: 95-100, 1975.
- SILK, D.B.; CHUNG, Y.C.; BERGER, K.L.; CONLEY, K.; BEIGLER, M.; SLLEISENGER, M.H.; SPILLER, G.A.; KIM, Y.S. Comparision of oral feeding of peptide and aminoacid meals to normal human subjects. Gut 20: 291-295, 1979.

- SILK, D.B.; MARRS, T.C.; ADDISO, J.M.; BURSTON, D. ; CLARK, M.L.; MATTHEWS, D.M. absorption of aminoacids from an aminoacid mixture simulating casein and a tryptic hydrolysate of casein in man. Clin. Sci. 45: 715-719, 1973.
- SILK, D.B.A.; GRIMBLE, G.K.; REES, R.G. Protein digestion and amino acid and peptide absorption. Proc. Nutr. Soc. 44: 63-72, 1985.
- SMITH, B.J.M.; ARTEAGA, C.; HEYMSFIELD, S.B. Increased ureagenesis and impaired nitrogen use during infusion of a synthetic aminoacid formula. N. Engl. J. Med. 306: 1013-1118, 1982.
- SMITH, C.G.; MUNRO, P.A.; OTTER, D.E.; BRAUER, R.M. Solubilization of spray-dried lactoalbumin by Alcalase. J. Dairy Research 56: 87-95, 1989.
- SNYDER, H.E. & KWON, T.W. Nutritional attributes of soybeans and soybeans products. In: Soybean utilization. AVI, New York, 1987. p. 188-208.
- SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Cereal Chem. 30(7): 1190-1206, 1958.
- SPINELLI, J.; KOURY, B.; MILLER, R. Approaches to the utilization of fish for the preparation of protein isolates. Enzymic modifications of myofibrillar fish protein. J. Food Sci. 37: 604-608, 1972.
- STAHMANN, M.A.; WOLDEGIORGIOS, G. Enzymatic methods for protein quality determinations. In: FRIEDMAN, M. ed. Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds. New York, Marcel Dekker, 1975. p.211.
- STEINKE, F.H. Protein efficiency ratio. Pitfalls and causes of variability: A Review. Cereal Chem. 54: 949-957, 1977.
- TAUDORF, E.; BUNDGAARD, A.; HANCKE, S.; HANSEN, L.V.; PRAHAL, F.; WEEKE, B. Non hydrolysed and hydrolysed soy protein: A human immunological study. Allergy 39: 203-209, 1984.

- TORUN, B. Nutritional quality of soybean protein isolate: Studies in children of pre-school age. In: WILCKE, H.L.; HOPKINS, D.T.; WAGGLE, D.H. eds. Soy Protein and Human Nutrition. Academic Press, New York, 1979. p. 101-119.
- TORUN, B. Soybeans and soybean products in the feeding of children. J. Am. Oil Chem. Soc. 58: 460-464, 1981.
- TORUN, B.; VITERI, F.E.; YOUNG, V.R. Nutritional role of soy protein for human. J. Am. Oil Chem. Soc. 58: 400-406, 1981.
- TRUSWELL, A.S. Evolution of dietary recommendations, goals and guidelines. Am. J. Clin. Nutr. 45: 1060-1072, 1987.
- TURGEON, S.L. & GAUTHIER, S.F. Whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process: production and characterization. J. Food Sci. 55 (1): 106-110, 1990.
- UMETSU, H.; MATSUOKA, H.; ICHISHIMA, E. Debittering mechanism of bitter peptides from milk casein by wheat carboxypeptidase. J. Agric. Food Chem. 31: 50-53, 1983.
- VOROB'EV, M.M.; SLOBODYNIKOVA, L.S.; VITT, S.V.; LATOV, V.K.; BELIKOV. Kinetic description of proteolysis part 4. Hydrolysis kinetics of partial protein hydrolysates. Die Nahrung. 31: 777-782, 1982.
- WATANABE, M.; MATSUMURA, M.; YABUKI, S.; AIZAWA, M.; ARAI, S. Construction of a bioreactor with immobilized yeast cells for production a low-phenylalanine mixture as a phenylketonuric foodstuff. Agric. Biol. Chem. 52: 2989-2984, 1988.
- WATTS, J.H.; TOLBERT, B.; ROFF, W.L. Nitrogen balance for young adult males fed with nonessential nitrogen at two levels of total nitrogen intake. Metab. Clin. Exp. 13: 172-180, 1964.

- WHITAKER, J.R. & PUIGSERVER, A.J. Fundamentals and applications of enzymatic modifications of proteins: an overview. In: FEENEY, R.E. & WHITAKER, J.R. eds. Modifications of proteins. Food, Nutritional and pharmacological aspects. ACS Symposium series n 198. American Chemical Society, Washington, DC, 1982. p.57.
- WHITE, A., HANDLER, P., SMITH, E.L.; HILL, R.L.; LEHMAN, I.R. The proteins III: aminoacids sequences and conformation of proteins. In: Principles of Biochemistry. Tokyo, ed. McGraw Hill Kogakusha, 1978, p.140.
- WILLIAMS, P.C. The use of titanium dioxide as a catalyst for large scale kjeldhal determination of the total nitrogen content of cereal grains. J. Sci. Food Agric. 24: 343-348, 1973
- WINITZ, M.; GRAFF, I.; GALLAGHER, N.; WARKIN, A.; SEEDMAN, D.A. Revolution of chemical diets as nutrition for man in space. Nature. 205: 741-743, 1965.
- WISE, A. Dietary factors determining the biological activities of phytate. Nutr. Asstr. Rev. Ser. A 53: 791-806, 1983.
- WOLZACK, A.A.; BRESSANI, R.; BRENES, R.G. A comparision of "in vivo" and "in vitro" estimates of protein digestibility of native and thermally processed vegetable proteins. Qual. Plant. Plants Foods Hum. Nutr. 31: 31-43, 1981.
- YAMASHITA, M.; ARAI, S.; FUJIMAKI, M. A low phenilalanine, high tyrosine as an acceptable dietetic food. Method for preparation by use of enzymatic protein hydrolysis and resynthesis. J. Food Sci. 41: 1029-1032, 1976.
- YAMASHITA, M.; ARAI, S.; FUJIMAKI, M. Applying proteolytic enzymes on soybeans IV: A ninhydrin-negative bitter peptide in peptic hydrolysate of soybean protein. Agric. Biol. Chem. 33: 321-330, 1969.

- YAMAMOTO, S.; KORIN, T.; ANZAI, M.; WANG, M.F.; HOSOI, A.; ABE, A.; KISHI, K.; INOUE, E. Comparative effects of protein, protein hydrolysate and amino acid diets on nitrogen metabolism of normal, protein-deficient, gastrectomized or hepatectomized rats. J. Nutr. 115: 1436-1446, 1985.
- YOUNG, V.R. Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. J. Am. Diet. Assoc. 91: 828-835, 1991.
- YOUNG, E.A.; HEULER, N.; RUSSEL, P.; WESER, E. Comparative nutritional analysis of chemically defined diets. Gastroenterol. 69: 1338-1345, 1975.
- YOUNG, V.R.; SCRIMSHAW, N.S.; BIER, D.M. Whole body protein and amino acid metabolism: relation to protein quality evolution in human nutrition. J. Agric. Food Chem. 29: 441-447, 1981.
- YOUNG, V.R.; SCRIMSHAW, W.S.; TORUN, B.; VITERI, F.E.. Soybean proteins in human nutrition: An overview. J. Am. Oil Chem. Soc. 56: 108-120, 1979.
- ZAKARIA, F. & McFEETERS, R.F. Improvement of emulsification properties of soy protein by limited pepsin hydrolysis. Lebensm. -Wiss. u. Technol. 11: 42-44, 1978.
- ZIQUUDROU, C.; STREATY, R.A.; KLEE, W.A. Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins. J. Biol. Chem. 254: 2446-2449, 1979.