



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FUNCIONAL  
DE PLASTEÍNA PRODUZIDA A PARTIR DE HIDROLISADO  
PANCREÁTICO DE ISOLADO PROTÉICO DE SOJA**

*Myrian Thereza Serra Martins*

Nutricionista

Tese para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição

**PARECER**

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Antonia Martins Galeazzi  
Orientadora

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Myrian Thereza Serra Martins, aprovada pela Comissão Julgadora em 15 de agosto de 2003.

Campinas, 15 de agosto de 2003.

CAMPINAS – SP  
2003

  
Prof. Dra. Maria Antonia Martins  
Galeazzi  
Presidente da Banca

UNIDADE	FC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	M366c
V	EX
TOMBO BCI	55652
PROC.	16-124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$11,00
DATA	17/9/03
Nº CPD	

CM00188939-5

Bib id 300074

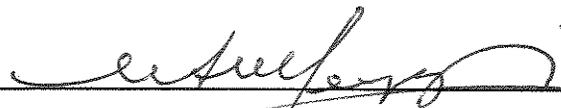
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

M366c Martins, Myrian Thereza Serra  
Caracterização química e funcional de plasteína produzida a partir de hidrolisado pancreático de isolado protéico de soja / Myrian Thereza Serra Martins. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Galeazzi, Maria Antonia Martins  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Soja. 2.Hidrólise. 3.Enzimas. 4.Pancreatina. I.Galeazzi, Maria Antonia Martins. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

**BAN EXAMINADORA**



**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Antonia Martins Galeazzi**  
Membro - Orientadora



**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Maria Netto**  
Membro

**Prof. Dr. Jayme Amaya-Farfán**  
Membro

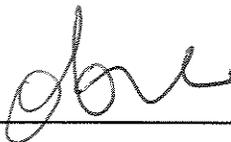


**Prof. Dr. Luiz Carlos Guedes de Miranda**  
Membro



**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vera Lúcia Signorelli Baldini**  
Membro

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gersislei Antonia Salado**  
Membro



**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gláucia Maria Pastore**  
Membro

Aos meus pais, Carlos e Lenice,  
por acreditarem em mim...

Ao meu núcleo familiar, por ordem de chegada:  
Vitoriano, Vítinho e Lucas,  
pelo amor, cumplicidade e paciência...

Aos amigos Dag e Renata,  
pela compreensão e acolhida em todos os momentos...

Dedico

## AGRADECIMENTOS

*À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Antonia Martins Galeazzi, pela amizade, apoio e orientação dedicados a este trabalho;*

*Aos professores da banca examinadora, pelas críticas e sugestões;*

*Aos amigos do Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação, Arlinda, Luiz, Edma, Anita, Semíramis, Cláudia, Rodrigo, Vítor, Lucas, Regina, Fred, pela colaboração, disponibilidade e cumplicidade;*

*Aos colegas do Departamento de Ciência, Tecnologia de Alimentos e Nutrição Básica-UFMT: Miriam, Dora, Regina, Salete, Niedja, Roberto, Odívia, Paulo, Gisela, Graça, Soraia, Waldeth, Salomé, Big, Job, Benedito, Marcio, Lucinda, Valmiro, Celso, pela atenção, paciência, compreensão e pela liberação de minhas atividades docentes;*

*Aos amigos Dag e Renata, pelo companheirismo, incentivo e apoio valioso na redação deste trabalho;*

*Aos técnicos de laboratório Edma, Liana, Soely e Eliana, pela colaboração e disponibilidade;*

*Ao secretário de Pós-Graduação da FEA, Cosme, pela gentileza e atenção;*

*Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Creuza, Cláudia, Geraldo e Antônio, pelo auxílio;*

*Ao Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação, pelo apoio e colaboração necessário para a concretização deste trabalho;*

*Ao Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina –USP/Ribeirão Preto, pela concessão da realização da análise de aminoácidos;*

*Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, pela liofilização do hidrolisado e plasteína.*

*A CAPES pela concessão da bolsa de estudos;*

*A Santista Alimentos S.A. pelo fornecimento do isolado protéico de soja;*

*A Deus e todos aqueles que permitiram a conclusão deste trabalho.*

---

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
RESUMO	xvii
SUMMARY	xix
INTRODUÇÃO GERAL	1

### CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Histórico e desenvolvimento do uso da soja na alimentação	5
2. Isolado Protéico de Soja (IPS)	15
3. Propriedades funcionais do isolado protéico de soja	17
4. Propriedades nutricionais do isolado protéico de soja	28
5. Modificação enzimática de proteínas	31
5.1. Hidrólise enzimática	32
5.2. Reação de síntese de plasteína	35
6. Referências bibliográficas	43

### CAPÍTULO 2

ARTIGO DE PESQUISA	55
Caracterização química e nutricional de plasteína produzida a partir de hidrolisado pancreático de isolado protéico de soja	57
Resumo	57

---

Summary	58
1. Introdução	59
2. Material e métodos	61
2.1. Material	61
2.2. Métodos	62
2.2.1. Composição centesimal da matéria prima: IPS	62
2.2.2. Produção de hidrolisado pancreático de IPS	62
2.2.3. Produção de Plasteína	63
2.2.4. Determinação do peso molecular	63
2.2.5. Escore químico de aminoácidos essenciais (EQ)	64
2.2.6. Análise estatística	65
3. Resultados e discussão	65
3.1. Caracterização da matéria prima	65
3.2. Produção do hidrolisado e plasteína	66
3.3. Caracterização do peso molecular	69
3.4 – Escore químico do IPS, Hidrolisado pancreático e plasteína	75
4. Conclusão	78
5. Referências bibliográficas	79

### CAPÍTULO 3

ARTIGO DE PESQUISA	87
Propriedades funcionais de plasteína produzida a partir de hidrolisado pancreático de isolado protéico de soja	89
Resumo	89

---

Summary	90
1. Introdução	91
2. Material e métodos	95
2.1. Material	95
2.2. Métodos	95
2.2.1. Produção do hidrolisado pancreático de IPS	
2.2.2. Produção da plasteína	96
2.2.3. Propriedades funcionais	96
2.2.4. Análise estatística	98
3. Resultados e discussão	98
3.1. Caracterização do hidrolisado e plasteína	98
3.2. Propriedades funcionais do hidrolisado e plasteína	98
4. Conclusão	107
5. Referências bibliográficas	108
 CONCLUSÃO GERAL	 113
 ANEXO - Referente ao capítulo 3	 115
Ficha de avaliação sensorial	117

**LISTA DE TABELAS**

## CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>TABELA 1.</b> Composição centesimal da soja e dos principais produtos derivados	8
<b>TABELA 2.</b> Composição dos aminoácidos essenciais - AAE (g/16gN) presentes nos grãos de soja, na farinha, no concentrado protéico, no isolado protéico (IPS), na proteína vegetal texturizada (PVT) e requerimento padrão da FAO	9
<b>TABELA 3.</b> Efeitos de diferentes ácidos graxos alimentares nos níveis de colesterol sérico	11
<b>TABELA 4.</b> Propriedades Funcionais do Isolado Protéico de Soja (IPS) e os sistemas alimentares aplicados	21
<b>TABELA 5.</b> Principais propriedades físico-químicas e funcionais de hidrolisados protéicos	24
<b>TABELA 6.</b> Alérgenos alimentares mais freqüentes na população infantil e adulta	27
<b>TABELA 7.</b> Escore químico de aminoácidos essenciais corrigidos pela digestibilidade (PDCAAS) de diversas fontes protéicas	30

## CAPÍTULO 2 - ARTIGO DE PESQUISA

Caracterização química e nutricional de plasteína produzida a partir de hidrolisado pancreático de isolado protéico de soja

<b>TABELA 1.</b> Composição centesimal aproximada do isolado protéico de soja	66
---	----

<b>TABELA 2.</b> Distribuição de peso molecular (PM) do hidrolisado e plasteína de IPS obtidos através da eletroforese em gel de poliacrilamida (4-20%), na presença de dodecil sulfato de sódio de sódio (SDS-PAGE) e cromatografia de exclusão molecular em gel Sephacryl S-200, eluído em tampão fosfato 0,05M, pH 5,8	73
<b>TABELA 3.</b> Escore químico de aminoácidos essenciais (EQ) do hidrolisado e plasteína de IPS	76
<b>CAPÍTULO 3 - ARTIGO DE PESQUISA</b>	
Propriedades funcionais de plasteína produzida a partir de hidrolisado pancreático de isolado protéico de soja	
<b>TABELA 1.</b> Solubilidade do Nitrogênio (%) do IPS, hidrolisado e plasteína, utilizando 2mg/mL de proteína	100
<b>TABELA 2.</b> Capacidade emulsificante do IPS, hidrolisado e plasteína (mL de óleo/100mL de emulsão) analisada à temperatura ambiente, nas concentrações de 2,5 e 5,0% de proteína	101
<b>TABELA 3.</b> Capacidade espumante e sinérese do IPS, hidrolisado e plasteína, sendo utilizado 3% de amostra	102
<b>TABELA 4.</b> Viscosidade, Torque e Força de cisalhamento do IPS, hidrolisado e plasteína, determinada em viscosímetro Brookfield DV3 com spindler N° 18 à temperatura de 25°C	104

---

**LISTA DE FIGURAS****CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

**FIGURA 1:** Fluxograma para obtenção do Isolado Protéico de Soja (IPS) 16

**FIGURA 2.** Possível mecanismo envolvido na reação de síntese de plasteína 36

**CAPÍTULO 2 - ARTIGO DE PESQUISA**

Caracterização química e nutricional de plasteína produzida a partir de hidrolisado pancreático de isolado protéico de soja

**FIGURA 1.** Curva de calibração da eletroforese em gel de poliacrilamida (4-20%), em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A SDS-PAGE foi realizada em sistema de tampão contínuo de SDS-Tris-Glicina 0,025M e pH 8,3 70

**FIGURA 2.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (4-20%), na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) do IPS, hidrolisado pancreático e plasteína de PIS. Colunas 1 e 7: Padrão; Coluna 2: IPS; Coluna 3: Hidrolisado de IPS; Coluna 4: Plasteína de IPS; Coluna 5: Pancreatina (5mg/mL) e Coluna 6: Pancreatina (2,5mg/mL) 70

**FIGURA 3.** Curva de calibração dos padrões moleculares em gel Sephacryl S-200 eluído em tampão fosfato 0,05M; pH 5,8 e detectado em absorvância de 280nm 72

**FIGURA 4.** Cromatografia de exclusão molecular em gel Sephacryl S-200 do hidrolisado pancreático e plasteína de IPS, eluído em tampão fosfato 0,05M; pH 5,8 e detectado em absorvância de 280nm 72

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização química e funcional da plasteína produzida a partir de hidrolisado pancreático de isolado protéico de soja (IPS). O hidrolisado de IPS foi produzido em um reator de sistema descontínuo, usando-se 5% de substrato, relação enzima/substrato 1/20, durante 6h, a 37°C, sob agitação. O grau de hidrólise, determinado através da solubilidade do nitrogênio em TCA a 10%, foi de 83,7%. A plasteína foi produzida a partir deste hidrolisado na concentração de 40% em solução aquosa, pH 7, durante 24h a 37°C, sob repouso. A produtividade da plasteína, determinada através da insolubilidade do nitrogênio em TCA a 10%, foi de 65,8%. Na caracterização química, foi verificada a distribuição dos pesos moleculares do hidrolisado e da plasteína por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e cromatografia de exclusão molecular. A SDS-PAGE não permitiu a visualização das bandas tanto no hidrolisado quanto na plasteína. A cromatografia de exclusão molecular indicou diferenças na distribuição do peso molecular do hidrolisado e plasteína. O hidrolisado apresentou 5 frações de PM na faixa de 5,4 a 66,2 kDa e a plasteína com 2 frações de PM na faixa de 9,6 e 58,7 kDa. O escore químico de aminoácidos essenciais confirmou a presença dos aminoácidos sulfurados como limitantes sendo obtido os valores de 93,2 e 96,4% para o hidrolisado e plasteína, respectivamente. A possível aplicação tecnológica destes produtos foi avaliada através das propriedades funcionais. A solubilidade em água destilada, solução tampão fosfato 10mM e solução de ácido acético 50% (v/v) foi igual e em torno de 86% para o IPS, 93% para o hidrolisado e 92% para a plasteína. Em solução de SDS 0,3M, não houve diferença significativa, enquanto que em solução de TCA 10%, a solubilidade diferiu entre as amostras, sendo maior no hidrolisado (82,90%), seguido pela plasteína (35,08%) e IPS (21,43%). A capacidade emulsificante, determinada em água destilada e solução de NaCl 0,5M mostrou ser maior no IPS, seguido pela plasteína e hidrolisado. Esta capacidade foi maior em água do que em solução de NaCl 0,5M, em todos os produtos avaliados. A modificação enzimática também promoveu um aumento da capacidade espumante, sendo maior na plasteína (46,6%), quando comparada ao hidrolisado (40,0%) e IPS (13,3%). A sinérese foi proporcional à capacidade espumante, sendo maior na plasteína (36,0%). A

viscosidade diminuiu com o processo de modificação enzimática e com o aumento das rotações em que foram submetidos. Houve diferença entre a viscosidade do IPS, hidrolisado e plasteína, somente quando as amostras foram submetidas à rotação de 100 rpm (3,9; 4,5 e 5,2 cP, respectivamente). A partir de 150 rpm, a viscosidade diminuiu e não diferiram entre si. Isto demonstrou um comportamento tixotrópico do hidrolisado e plasteína. A osmolalidade do hidrolisado foi de 328 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O e da plasteína de 342 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O. O grau de sabor amargo do hidrolisado e plasteína de IPS apresentou os valores médios de 1,8 para o IPS; 3,7 para o hidrolisado e 2,9 para a plasteína, numa escala de 5 pontos, sendo que a menor nota se refere ao produto menos amargo. A reação de síntese de plasteína promoveu um aumento da capacidade espumante e emulsificante, uma melhora no sabor amargo e valores similares de solubilidade, osmolalidade e escore químico de aminoácidos essenciais, quando comparada ao hidrolisado pancreático de IPS. Esta reação mostrou ser uma alternativa viável na utilização de produtos alimentares para diversos fins, e em especial, bebidas com ampla variação de pH, concentração e condições de processamento com rotação controlada (100 rpm).

**Palavras-chave:** plasteína, isolado protéico de soja, propriedade funcional, hidrólise enzimática, pancreatina.

## SUMMARY

The objective of this research was to characterize, both, chemically and functionally, plastein obtained from a pancreatic hydrolysate of soy protein isolate (SPI). The SPI hydrolysate was produced by an enzymatic discontinuous process in a hydrolysis reactor, with a 5% substrate concentration, an enzyme/substrate ratio of 1/20, and an incubation temperature of 37°C for 6 hours under constant stirring. The degree of hydrolysis, determined by nitrogen solubility in 10% TCA, was 83.7%. The plastein was produced from this hydrolysate with a 40% substrate (w/v) at a pH of 7 at 37°C, for 24 hours without stirring. The yield of plastein, determined through nitrogen insolubility in 10% TCA was 65.8%. The protein profile was analyzed by gel electrophoresis in polyacrylamide gel, in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) and by molecular exclusion chromatography. The SDS-PAGE did not permit the bands visualization. The molecular exclusion chromatography pointed out differences in the molecular weight (MW) profiles of the hydrolysate and plastein. The SPI hydrolysate presented 5 zones in the region between 5.4 and 66.2 kDa while plastein presented 2 zones in the MW of 9.6 and 58.7 kDa. The hydrolysate showed a more homogeneous MW distribution. The amino acid scoring showed that the limiting amino acids were the sulfur-containing amino acids, reference values of 93.2 and 96.4% were observed for the hydrolysate and plastein, respectively. The functional properties of these proteins were evaluated for technological applications. The solubility was modified by medium dissolution of protein sources, being approximately 86% for the SPI, 93% for the hydrolysate and 92% for the plastein in water, 10 mM sodium phosphate buffer and 50% acetic acid (v/v). In 0.3M SDS there has been no difference among the SPI, hydrolysate and plastein, whereas that in 10% TCA the solubility differed in the hydrolysate (82.9%), plastein (35.08%) and SPI (21.43%). The emulsifying capacity was analysed in water and 0.5M NaCl. It was greater in SPI followed by hydrolysate and plastein. This capacity was higher in water than in 0.5M NaCl for all the products analyzed. The enzymatic modification resulted in a higher foam capacity. The foam capacity of plastein was higher (46.6%) than that of the hydrolysate (40%) and SPI (13.3%). The syneresis was proportional that the foam capacity and bigger in plastein (36.0%).

The viscosity decreased with the enzymatic modification process and with the increase of rotation used. There has been difference among the SPI, hydrolysate and plastein when submitted to 100 rpm (3.9; 4.5 and 5.2 cP, respectively). However, from 150 rpm, the viscosity decreased and no difference was found. This behavior showed that either hydrolysate or the plastein of SPI might be considered thixotropic gel. The osmolarities of the hydrolysate and the plastein were 328 and 342 mOsm/kg H<sub>2</sub>O, respectively. The taste scores of SPI, hydrolysate and plastein were 1.8; 3.7 and 2.9, respectively, on a scale of 5 points. The smaller score refers to the less bitter product. The synthesis reaction of the plastein caused increase of foam and emulsifying capacity, an improvement in the bitter taste and similar values of solubility, osmolality and chemical scoring of essential amino acid when compared to SPI hydrolysate. These results suggest that the plastein reaction is a viable alternative in the use of food products for several purposes, in special beverages with a large pH range, concentration and controlled rotation conditions (100 rpm) variation.

**Key words:** plastein, soy protein isolate, functional properties, enzymatic hydrolysis, pancreatin.

## INTRODUÇÃO GERAL

O interesse na utilização de proteínas vegetais e seus derivados pela indústria de alimentos têm crescido nos últimos anos. A soja é uma importante fonte de proteínas e tem se destacado neste contexto. Devido às suas qualidades nutricionais e funcionais, à disponibilidade no mercado nacional, baixo custo e desenvolvimento de tecnologia apropriada, o uso da proteína de soja tem aumentado entre os povos ocidentais. O Isolado Protéico de Soja (IPS) é um dos derivados de soja que tem sido muito empregado em pesquisas na área de ciência e tecnologia de alimentos. Sua composição, propriedades nutricionais e funcionais depende principalmente do processamento e da variedade do grão.

O IPS tem sido amplamente utilizado como matéria prima para a produção de hidrolisado enzimático. A distribuição do peso molecular de produtos obtidos a partir de modificação enzimática irá definir sua aplicação. As propriedades terapêuticas da soja pesquisadas mais recentemente colocam em evidência sua utilização na prevenção de doenças crônicas como o câncer e aterosclerose.

O IPS pode sofrer modificação de natureza química, térmica ou enzimática conforme o produto desejado. A modificação enzimática de proteínas é realizada por várias razões incluindo melhora das características nutricionais e funcionais, prevenção de interações indesejáveis e produção de peptídeos de baixo peso molecular utilizados em formulações para nutrição clínica.

Embora a função nutricional das proteínas e sua importância para a manutenção da boa saúde física e mental sejam amplamente reconhecidas, os conceitos de qualidade nutricional das proteínas têm sido largamente discutidos e modificados nos últimos anos. A utilização de dietas contendo soja e hidrolisado enzimático como fonte protéica exclusiva tem sido avaliada por diversos autores e considerada suficiente como única fonte de nitrogênio e aminoácidos essenciais.

Durante a produção de hidrolisado protéico através de enzimas pode ocorrer o desenvolvimento de peptídeos amargos limitando sua aplicação. Vários métodos têm sido pesquisados com o objetivo de remover este sabor amargo. Entre eles podemos citar a separação seletiva e a reação de plasteína.

A reação de plasteína pode ser considerada um processo enzimático que ocorre de modo reverso à hidrólise catalisada por proteinases. Operacionalmente, a formação de plasteína é definida como a formação de material insolúvel em solução de TCA 10%, etanol 70% ou acetona. Os mecanismos responsáveis pela formação da plasteína não estão completamente elucidados, sendo considerados a ocorrência de ligação peptídica (condensação e/ou transpeptidação), agregação iônica e hidrofóbica. Estudos relatados na literatura são controversos principalmente devido à falta de padronização na produção e caracterização da plasteína.

As propriedades da plasteína dependem do grau de degradação do hidrolisado, da natureza do substrato, do tipo de proteinases e das condições específicas da reação. Estas condições influem na distribuição do peso molecular e composição de aminoácidos, e assim, nas suas propriedades funcionais e nutricionais.

O presente trabalho teve como objetivo proceder à caracterização química e funcional da plasteína produzida a partir de hidrolisado de IPS, utilizando a pancreatina como sistema enzimático, visando sua possível aplicação na alimentação humana. Neste contexto, foram verificados a distribuição de peso molecular, o escore químico dos aminoácidos essenciais e as propriedades funcionais.

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1. HISTÓRICO E DESENVOLVIMENTO DO USO DA SOJA NA ALIMENTAÇÃO.

O interesse na utilização de proteínas vegetais e seus derivados pela indústria de alimentos têm crescido nos últimos anos [100]. A soja é uma importante fonte de proteínas e tem se destacado neste contexto. Devido às suas qualidades nutricionais e funcionais, disponibilidade de mercado, baixo custo e desenvolvimento de tecnologia apropriada, o uso da proteína de soja tem aumentado entre os povos ocidentais [10].

A produção da soja no Brasil aumentou muito, principalmente a partir da década de 80, quando houve um incremento na produtividade. De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE), do volume total de 42,2 milhões de toneladas da safra 2001/2002, perto de 17,5 milhões (41,2%) deverão ser exportadas in natura e 23,7 milhões (56%) serão esmagadas internamente. Os principais países produtores de soja são: Estados Unidos, Brasil, Argentina e China, respectivamente [65].

A demanda mundial de soja vem crescendo em torno de 5% ao ano. Esse fato decorre principalmente do aumento de consumo de fontes de proteína vegetal, principalmente na Europa e Japão. É importante ressaltar que o Brasil é um país com reais possibilidades de aumento de produção porque dispõe de grandes extensões de áreas cultiváveis, especialmente na região Centro-Oeste [63].

A soja brasileira, considerada como “soja tropical”, apresenta em sua composição uma média de 21% de óleo e 42% de proteína no farelo decorrente do esmagamento. A soja de clima frio (americana, argentina e chinesa) contém 18% de óleo e 38% de proteína [23, 63].

A soja, pertencente à família Leguminosae e ao gênero *Glycine*, é colhida quando seus grãos atingem o conteúdo máximo de matéria seca, devido principalmente às facilidades de colheita e de armazenamento dos grãos [13].

É originária da região leste da Ásia, muito provavelmente da região Centro-Sul da China. As primeiras citações sobre a soja não são precisas, sendo descrito publicações no ano 2.838 a.C. e também inscrições mais antigas, em chinês. A soja foi introduzida na Europa

provavelmente no final do século XV, apenas como curiosidade nos jardins botânicos da Inglaterra, França e Alemanha [23, 97].

Sua produção ficou localizada na China até o final da guerra entre a China e o Japão (1894-95). Em 1904, foi introduzida para cultivo na Rússia. A partir de 1908, a soja grão e produtos derivados foram enviados à Europa e, então, passaram a receber atenção mundial. Nos EUA as primeiras citações de pequenas áreas de cultivo datam do início do século XIX. O primeiro boletim do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) inteiramente dedicado à soja foi publicado por Williams (1899), e versava sobre soja forrageira. A soja foi utilizada como planta para forragem durante vários anos. Em 1941, a área cultivada para grãos (2,4 milhões de hectares) excedeu a área para forragem (2,2 milhões de hectares) pela primeira vez. A história recente mostra também grande evolução da soja em países como o Brasil, Argentina, China e Índia que, juntamente com os Estados Unidos, são os maiores produtores mundiais [23, 97].

A soja no Brasil, até meados dos anos 60, não tinha a importância econômica da cana-de-açúcar, do algodão, do milho, do arroz, do café, da laranja e do feijão. No entanto, a partir do final dos anos 60, a soja tornou-se economicamente importante e a produção era concentrada quase que exclusivamente no Estado do Rio Grande do Sul, com alguns campos em Santa Catarina e no Paraná. Nos anos 80, os Cerrados brasileiros começaram a ter importância econômica como região produtora [23, 63].

Os fatores mais relevantes que contribuíram para esse cenário foram: (i) significativo aumento do preço internacional dos produtos primários, no início dos anos 70; (ii) condições favoráveis de comercialização internacional da soja brasileira que tem a safra no período da entressafra americano; (iii) possibilidade de importação de cultivares de soja do Sul dos Estados Unidos; (iv) incentivos governamentais à cultura do trigo que utilizava a mesma estrutura de capital fixo da soja (máquinas e equipamentos), baixando os custos de produção; (v) estrutura cooperativista operante tanto na produção quanto na comercialização; (vi) melhora no nível das tecnologias oferecidas, que possibilitaram o aumento da produtividade nas regiões tradicionais e o aumento da área nas regiões dos Cerrados (baixas latitudes); (vii)

agilidade e interação da pesquisa e extensão, facilitando o acesso às novas tecnologias; (viii) aumento da capacidade de processamento de soja. A capacidade instalada passou de 1,4 milhões de toneladas, em 1970, para 21,0 milhões, em 1980; (ix) rápido crescimento da avicultura nacional, entre 1965 e 1975; (x) alteração da política econômica, a partir de 1968 que influenciou na taxa de câmbio e favoreceu as exportações; (xi) grande demanda por proteína devido à redução na produção mundial de farinha de peixe no início dos anos 70 [23].

Em 2002, o Brasil foi o principal exportador de farelo de soja, detendo 32% do mercado mundial, o que significa uma considerável exportação de proteína. O mercado interno concentra-se no consumo de óleo e ração animal, não sendo significativo o consumo direto da soja na alimentação humana [63].

Os principais produtos derivados do processamento da soja incluem: farinha, concentrado protéico, isolado protéico (IPS) e extrato hidrossolúvel, sendo usados em uma variedade de alimentos, como ingrediente principal ou como complemento protéico e/ou funcional.

A *Tabela 1* mostra a composição centesimal da soja e de alguns dos seus principais derivados. Cerca de 60% do peso seco da soja é constituído de óleo e proteína. Considerando um teor de água em torno de 13%, a soja possui aproximadamente 35% de proteína, 17% de óleo, 31% de carboidrato e 4,4% de cinzas. Em geral, a soja cultivada possui 8% de casca, 90% de cotilédone e 2% de gérmen [63].

A soja é essencialmente uma fonte de proteínas cujo valor nutricional apresenta bom balanceamento de aminoácidos essenciais com exceção da deficiência dos aminoácidos sulfurados (metionina e cistina) e alto teor do aminoácido lisina, que é limitante nos cereais (*Tabela 2*). A combinação de leguminosas e cereais complementa o balanço de aminoácidos essenciais, obtendo-se uma composição protéica de boa qualidade. A mistura brasileira de arroz e feijão ilustra bem esta aplicação e deveria ser uma prática estimulada pelos profissionais de saúde envolvidos na área de alimentação e nutrição.

**TABELA 1.** Composição centesimal da soja e dos principais produtos derivados<sup>1</sup>.

<b>Alimento</b>	<b>Carboidrato<sup>2</sup></b>	<b>Lípido<sup>2</sup></b>	<b>Proteína<sup>2</sup></b>	<b>Fibra<sup>2</sup></b>	<b>Umidade<sup>3</sup></b>	<b>Cinzas<sup>3</sup></b>
Soja crua	30,20	19,90	36,50	16,50	10,20	5,00
Soja cozida	9,93	8,98	16,60	6,27	64,10	2,00
Farinha de soja <sup>4</sup>	20,70	11,70	37,80	1,98	8,00	5,70
Concentrado protéico de soja <sup>4</sup>	tr <sup>5</sup>	0,90	71,00 <sup>6</sup>	0,80	9,00	4,00
Isolado Protéico de soja	tr	0,70	92,00 <sup>6</sup>	0,30	5,00	4,00
Extrato hidrossolúvel de soja	1,82	1,92	2,76	1,31	74,50	0,80
Extrato de soja em pó	58,80	19,80	14,00	0,70	4,20	5,70
Proteína vegetal texturizada (PVT)	30,51	1,24	52,40	Nd <sup>7</sup>	nd	nd
Tofu (queijo de soja)	0,70	4,20	8,10	0,30	70,90	12,50
Missô (massa de soja fermentada)	28,00	6,08	11,80	5,41	44,40	11,60
Shoyo (molho de soja)	nd	nd	6,67	nd	62,80	20,80

<sup>1</sup> Valores expressos como g/100g do alimento

<sup>2</sup> PHILIPPI [73]

<sup>3</sup> IBGE [42]

<sup>4</sup> SAMRIG [79]

<sup>5</sup> tr = traço

<sup>6</sup> (N x 6,25) base seca

**TABELA 2.** Composição dos aminoácidos essenciais - AAE (g/16gN) presentes nos grãos de soja, na farinha, no concentrado protéico, no isolado protéico (IPS), na proteína vegetal texturizada (PVT) e requerimento padrão da FAO [25].

AAE	Padrão FAO	Grão	Farinha	Concentrado	IPS	PVT
Cistina	4,2	1,3	1,6	1,6	1,3	1,5
Isoleucina	4,2	4,5	4,7	4,8	4,9	4,7
Leucina	4,8	7,8	7,9	7,8	7,8	7,8
Lisina	4,2	6,4	6,3	6,3	6,4	6,1
Metionina	2,2	1,3	1,4	1,4	1,3	1,2
Fenilalanina	2,8	4,9	5,3	5,2	5,3	5,0
Treonina	2,8	3,9	3,4	4,2	3,6	4,2
Triptofano	1,4	1,3	1,3	1,5	1,4	1,1
Tirosina	2,8	3,1	3,8	3,9	4,3	3,3
Valina	4,2	4,8	5,1	4,9	4,7	4,8

Fonte: WEIGHARTNER [95].

As proteínas podem ser classificadas pela sua solubilidade e pelo seu coeficiente de sedimentação. Quanto à solubilidade, as proteínas da soja estão divididas em albuminas (solúveis em água) e globulinas (solúveis em solução salina), que se apresentam em maior proporção. O coeficiente de sedimentação, usado para identificar proteínas, caracteriza a soja contendo quatro frações designadas como 2, 7, 11 e 15S (S = unidade de Svedburg). Os principais componentes da proteína da soja são as frações 7S ( $\beta$ -amilase, lipoxigenase e  $\beta$ -conglucina) e 11S (glicina) [53].

Estas frações apresentam diferentes propriedades nutricionais e funcionais. Em geral, a fração 11S contém de 3 a 4 vezes mais aminoácidos sulfurados por unidade de proteína que a 7S e possui maior habilidade para formar gel, enquanto a fração 7S apresenta melhor capacidade emulsificante e de estabilidade da emulsão [53].

Estudos com proteínas de soja mostram a relação entre a estrutura e sua propriedade funcional. Os estudos sugerem que: a) a instabilidade térmica das subunidades da proteína, como a glicinina, está relacionada à habilidade de formar gel termo-induzido; b) a hidrofobicidade é um fator importante nas propriedades emulsificantes e, c) as propriedades de superfície protéica dependem da estabilidade de conformação e também influem nas propriedades emulsificantes [53].

A soja contém de 30 a 35% de carboidratos que no entanto possuem menor valor econômico que o óleo. O principal uso destes carboidratos têm sido como fonte energética na alimentação animal. A soja contém traços de monossacarídeos, quantidades maiores de di- e oligossacarídeos, na faixa de 2,5 a 8,2%. Basicamente, os oligossacarídeos da soja são açúcares não-redutores, contendo frutose, glicose e galactose com 2 ou mais unidades, ligadas por ligações  $\beta$ -fructosídica e  $\alpha$ -galactosídica [23].

Entre os carboidratos solúveis, a rafinose e estaquiose recebem mais atenção por estarem relacionadas à flatulência e desconforto abdominal quando para consumo humano. Quando consumidos, os oligossacarídeos não são digeridos no duodeno, sendo então metabolizados por microrganismos produzindo gases. Por outro lado, pesquisas recentes têm mostrado o efeito benéfico destes oligossacarídeos, os quais são denominados de alimentos prebióticos por permitirem o crescimento de bactérias bífidas e promoverem o equilíbrio da microbiota intestinal. Os carboidratos insolúveis da soja incluem celulose, hemicelulose, pectina e traços de amido, que são eliminados no processo de obtenção do isolado protéico [53, 64].

O óleo presente nos grãos de soja (20%) fornece energia e ácidos graxos essenciais. Do total de lipídios da soja, 86% são ácidos graxos insaturados e, 60% destes são constituídos

pelos ácidos graxos essenciais: oléico, linoléico e linolênico [23]. O óleo de soja refinado contém no mínimo 99% de triglicerídeos, eliminando durante o processamento cerca de 2% de fosfatídeos e 0,5% de ácidos graxos livres. O óleo de soja é amplamente utilizado na elaboração de diversos produtos alimentares, incluindo saladas, frituras, margarinas, maioneses e molhos em geral. Considerando que o óleo de soja não hidrogenado contém cerca de 53% de ácido linoléico e 8% de ácido linolênico, e que o óleo parcialmente hidrogenado ainda contém cerca de 23% de ácido linoléico e 3% de ácido linolênico, este é uma excelente fonte de ácidos graxos essenciais [53].

Estudos recentes indicam que os lipídeos alimentares têm um papel significativo na patogênese de distúrbios cardiovasculares e cancerígenos entre outros. Isto depende do comprimento da cadeia de carbono e do número e posição geométrica das duplas ligações. A *Tabela 3* mostra o resultado de um estudo realizado em humanos sobre a influência do ácido graxo alimentar nos níveis de colesterol sérico.

**TABELA 3.** Efeitos de diferentes ácidos graxos alimentares nos níveis de colesterol sérico

<b>Ácido graxo</b>	<b>Efeito sobre o colesterol sérico</b>
<i>Saturado</i>	
Caprílico (8:0)	Não aumenta e nem diminui
Cáprico (10:0)	Não aumenta e nem diminui
Láurico (12:0)	Aumenta
Mirístico (14:0)	Aumenta muito
Palmítico (16:0)	Aumenta
Esteárico (18:0)	Não aumenta e nem diminui
<i>Monoinsaturado</i>	
Oléico (18:1, n-9; cis)	Diminui
Elaídico (18:1, n-9; trans)	Aumenta
<i>Polinsaturado</i>	
Linoleico (18:2, n-6)	Diminui
$\alpha$ -Linolênico (18:3, n-3)	Diminui

Fonte: LIU [53].

As propriedades terapêuticas da soja colocam em evidência sua utilização na prevenção de doenças crônicas como o câncer e arteriosclerose. A proteína da soja e o isoflavonóide genisteína são os agentes responsáveis por este efeito preventivo. Como a genisteína tem estrutura química semelhante ao hormônio estrógeno, este composto é chamado de fitoestrógeno, porém com ação hormonal mais fraca. Devido a essa ação, os fitoestrógenos da soja amenizam os distúrbios causados pela menopausa, diminuindo as ondas de calor e a sudorese, reduzindo os riscos de ataque cardíaco e mantendo a densidade óssea, que previne a osteoporose [23, 64].

ROBERFROID [75] mostrou que pacientes que consumiram de 17 a 25g de proteína de soja por dia, tiveram uma redução média no nível de colesterol de 9,3%. Os níveis de LDL-colesterol foram reduzidos em 13%, enquanto que os níveis do HDL-colesterol não foram afetados. Os pacientes com os níveis mais altos de colesterol tiveram, também, as maiores reduções. Esse estudo demonstrou que o consumo de 25g de proteína de soja por dia, reduz de 20% a 30% os riscos com doenças coronárias.

A soja é rica em minerais (cerca de 5%), principalmente magnésio, fósforo, ferro e potássio. Entretanto, não é boa fonte de cálcio e zinco, recomendando-se, portanto, que haja suplementação destes dois minerais nos produtos de soja destinados às crianças, que não recebem dieta variada. Quanto ao conteúdo vitamínico, a soja é uma boa fonte de vitaminas hidrossolúveis (tiamina, riboflavina, niacina, ácido fólico e ácido pantotênico) e lipossolúveis ( $\beta$ -caroteno e vitamina E) [44].

Entre os fatores antinutricionais presentes na soja os mais importantes são: inibidores de proteases (Inibidor de tripsina Kunitz e Inibidor de Bowman-Birk), lectinas e fitatos. O inibidor de Kunitz possui peso molecular (PM) entre 20 e 25 kDa com especificidade ligada à tripsina, o qual se liga numa relação estequiométrica de 1:1. O inibidor de Bowman-Birk possui PM aproximado de 8 kDa e é capaz de se ligar a uma molécula de tripsina e a outra de quimotripsina em sítios ativos independentes [3, 39].

O efeito destes inibidores é controverso e está relacionado à diminuição da digestibilidade protéica, hipertrofia e hiperplasia pancreática e redução do crescimento em

animais. No entanto, pesquisas recentes têm mostrado a ação destes inibidores como agentes anticarcinogênicos, especialmente o inibidor de Bowman-Birk. O Inibidor de Kunitz é termolábil e o Inibidor de Bowman-Birk termoresistente, provavelmente devido à presença das ligações dissulfeto [3, 39, 53].

O fitato (hexafosfato de inositol) liga-se às proteínas em pH ácido formando o complexo fitato-proteína, reduzindo sua disponibilidade. O fitato ainda interfere na biodisponibilidade de microelementos e na formação do complexo proteína-fitato-mineral, o qual está associado à redução da biodisponibilidade de Ca, Zn, Mg e Fe. No entanto, quando a vitamina C é consumida junto com a soja, a absorção do ferro e zinco é melhorada. Embora o fitato interfira na absorção de cálcio, sua absorção é equivalente a dos produtos lácteos [53]. Pesquisas recentes relacionadas aos alimentos funcionais têm indicado o fitato como substância anticarcinogênica [64] e na redução dos níveis de colesterol sérico. Os fitatos não são inativados pelo calor [74] e seu teor varia conforme a variedade da soja entre 1 e 1,5% [53].

As lectinas, também chamadas de hemaglutininas, são proteínas e possuem capacidade de aglutinar eritrócitos e outros tipos de células. São caracterizadas pelo elevado teor de 4-hidroxiprolina e estão associadas à redução da absorção do ferro em ratos [52]. Como os inibidores de tripsina, as lectinas da soja são inativadas pelo calor úmido, porém são resistentes ao calor seco. Semelhante aos fitatos, pesquisas recentes têm indicado estes compostos como benéficos nas doenças cardiovasculares e prevenção do câncer. A análise risco/benefício dos fatores antinutricionais e funcionais da soja não estão totalmente esclarecidos. No entanto, a soja tem sido recomendada para consumo humano como alimento funcional na prevenção de diversas enfermidades [64].

Apesar das características nutritivas e dos efeitos benéficos à saúde humana, a soja não é um alimento de grande aceitabilidade e consumo no Brasil. Isto se deve, principalmente, ao seu sabor, que é exótico aos hábitos alimentares dos brasileiros. Sabe-se que os compostos oriundos da ação da enzima lipoxigenase (LOX) são responsáveis, em parte, pelo sabor característico da soja. A LOX catalisa a reação do ácido linoléico e outros lipídeos

poliinsaturados em presença de oxigênio formando hidroperóxidos, os quais são clivados em compostos carbonílicos voláteis (aldeídos, cetonas e álcool) que são os principais responsáveis pelo flavor da soja e seus derivados [53].

Essa enzima é facilmente inativada através de tratamento térmico. Portanto, quando são preparados alimentos à base de soja, é necessário que sejam observadas algumas técnicas especiais, dentre elas o choque térmico, para se obter produtos de melhor sabor. Nos grãos de soja inteiros e mesmo quebrados ou moídos, quando secos, não ocorre o desenvolvimento do sabor desagradável, porque a enzima lipoxigenase e os lipídios (substrato da enzima) encontram-se em compartimentos separados. Porém, quando os grãos quebrados ou moídos são colocados em água fria, a reação enzimática é ativada, desenvolvendo o sabor desagradável. Para evitar o desenvolvimento desse sabor característico basta adicionar os grãos inteiros, quebrados ou moídos em água fervente, o que inativa a enzima. Após esse tratamento, a soja está pronta para ser utilizada em qualquer receita tradicional [23].

Programas de melhoramento genético da soja para obtenção de cultivares com características mais adequadas para a alimentação humana têm sido desenvolvidos pela Embrapa, Universidade Federal de Viçosa e Instituto Agrônomo de Campinas. Nestes programas, os cruzamentos envolvem caracteres tais como: melhor sabor, alto teor de proteínas, redução de fatores antinutricionais, tamanho de sementes (grandes e pequenas), cor do hilo (amarelo), além de rendimento e resistência às doenças [10, 23].

Através do melhoramento genético, poderão ser disponibilizados cultivares de soja com características especiais, que permitem uma interação efetiva com a indústria de alimentos, desenvolvendo novos produtos, reduzindo os custos de processamento, melhorando a qualidade dos produtos, bem como disponibilizando cultivares para a utilização direta na alimentação humana [23].

## 2. ISOLADO PROTÉICO DE SOJA (IPS)

O Isolado Protéico de Soja (IPS) é tradicionalmente preparado a partir da farinha de soja desengordurada, resultante da extração de óleo, e geralmente contém no mínimo 90% de proteína (N x 6,25) em base seca. Estes diferem dos concentrados cujo teor de proteínas deve ser de no mínimo 70% e das farinhas que devem apresentar um mínimo de 50% de proteínas [65, 85]. Conforme a Legislação Brasileira [6] o Isolado Protéico de Soja deve possuir no mínimo 88,0% de proteína (N x 6,25) em base seca.

Na produção do IPS (*Figura 1*), primeiramente é feita uma extração em meio aquoso alcalino a partir da farinha ou flocos desengordurado de soja, com pH abaixo de 9. O extrato aquoso (contendo a parte protéica) é separado do resíduo fibroso (contendo principalmente carboidratos) por meio de filtração e centrifugação [85, 97].

Após esta separação, o extrato é acidificado até o pH 4,5 (ponto isoelétrico das principais proteínas da soja) para sua precipitação. Nesta etapa, a solubilidade do precipitado é mínima e a temperatura é mantida abaixo de 60°C. A proteína coagulada é separada, lavada e concentrada por filtração e centrifugação, podendo então passar por secagem, resultando finalmente no IPS. O rendimento no processo de obtenção da IPS é relativamente baixo, variando entre 30 e 40%, dependendo do conteúdo protéico da matéria-prima, do grau de desnaturação que a proteína sofre durante a extração do óleo, das condições de extração e da eficiência dos equipamentos de separação da proteína coagulada [85, 97].

Durante o processamento do IPS ocorrem: remoção dos carboidratos solúveis (rafinose e estaquiose); inativação do inibidor de tripsina; remoção ou diminuição de “off-flavors”; e aumento da digestibilidade das proteínas [85].

A composição, propriedade nutricional e funcional do Isolado Protéico de Soja depende principalmente do processamento e da variedade do grão. Cerca de 90% das proteínas de soja são globulinas. As principais frações protéicas da soja possuem peso molecular que variam de 8 a 600 kDa .

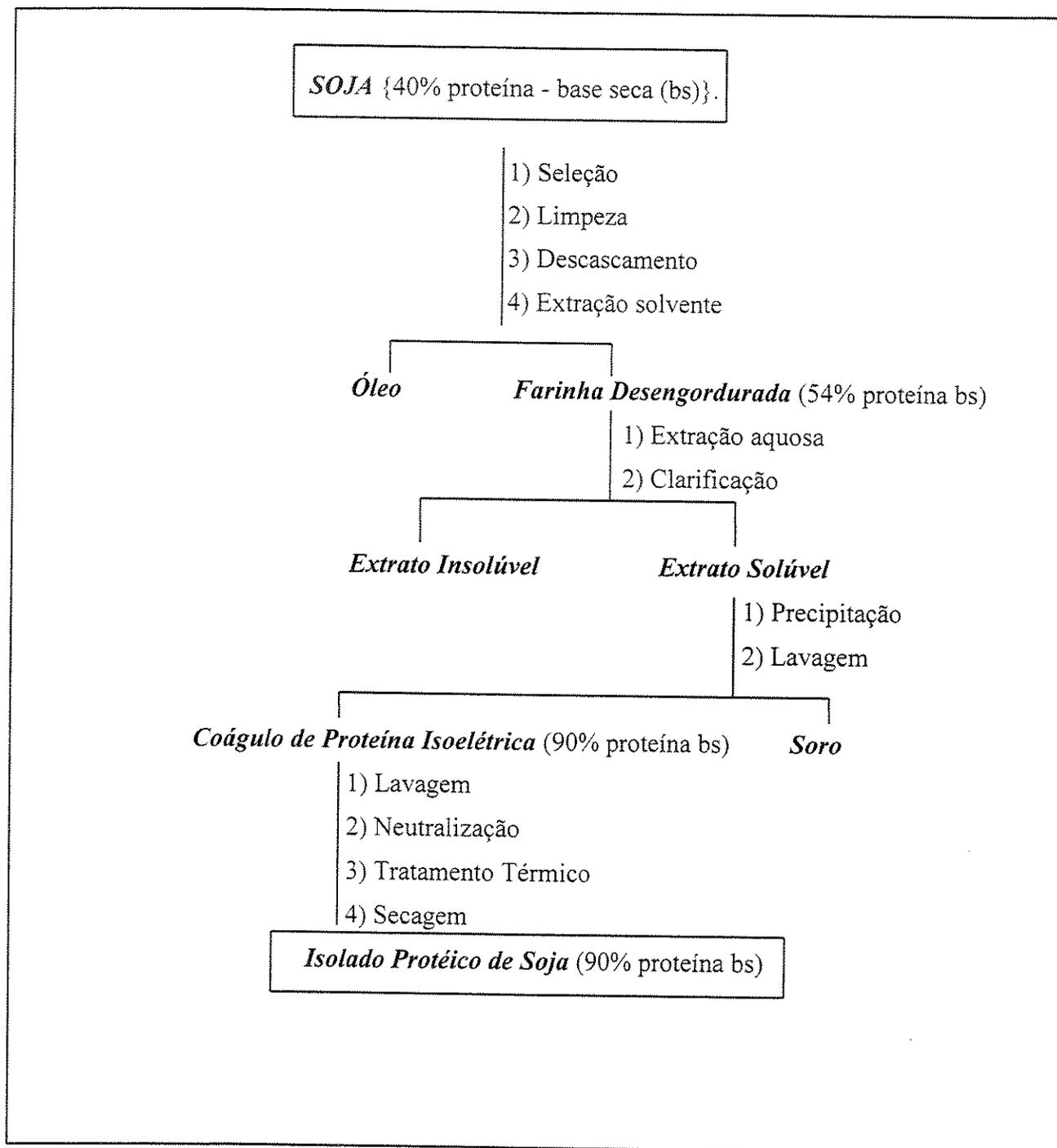


FIGURA 1: Fluxograma para obtenção do Isolado Protéico de Soja (IPS) [80].

### 3. PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO ISOLADO PROTÉICO DE SOJA

As propriedades funcionais das proteínas estão relacionadas com suas propriedades físicas, químicas e estruturais. Estas incluem tamanho, conformação, composição da molécula, seqüência, carga líquida e distribuição de aminoácidos, além da relação hidrofobicidade/hidrofilicidade. Os arranjos relacionados às estruturas secundária, terciária e quaternária, as ligações inter-e intrapeptídica, a flexibilidade/rigidez molecular em resposta às mudanças das condições ambientais e a natureza e interações com outros componentes também são importantes [19].

As proteínas têm duas propriedades importantes que são responsáveis por várias propriedades funcionais: solubilidade e propriedades hidrodinâmicas. A solubilidade é resultante das propriedades de superfície das proteínas assim como a capacidade espumante, emulsificação e capacidade de ligação com outros compostos como os flavorizantes. Em oposição, as propriedades hidrodinâmicas são afetadas pelo tamanho e conformação da proteína e são relativamente independentes da composição e distribuição de aminoácidos. Estas propriedades influem na viscosidade e geleificação [36].

A solubilidade de uma proteína pode ser matematicamente expressa como a quantidade de proteína presente na fase líquida em relação à quantidade total de proteína da fase sólido-líquido em equilíbrio. Tecnicamente, entretanto, a solubilidade protéica é um parâmetro operacional determinado pela retenção da proteína em um sobrenadante após centrifugação de uma solução por um dado tempo e força centrífuga. A solubilidade é influenciada pelos fatores pH, temperatura, força iônica, concentração de proteína e a presença de outros componentes [36].

Diferentes termos são usados na literatura para expressar a solubilidade da proteína. O termo dispersibilidade, comumente usado pela indústria de produtos lácteos, é uma propriedade que descreve a distribuição uniforme de um pó em água e é um critério diferente da solubilidade. O Índice de Dispersibilidade de Nitrogênio (IDP) e a Proteína Dispersível em Água (PDA) são dois índices geralmente usados para expressar a dispersibilidade. O Índice de

Solubilidade de Nitrogênio (ISN) foi originalmente desenvolvido para proteínas de soja e é o mais utilizado para avaliar a funcionalidade de proteínas em geral. Este índice relaciona o nitrogênio solúvel (determinado por Kjeldahl) e é expresso em porcentagem.

De acordo com BETSCHART [12], a solubilidade da maioria das proteínas diminui com o aumento da concentração destas, assim como com a aplicação de forças mais intensas ou centrifugações mais longas. A precipitação das proteínas pelo calor causa desnaturação irreversível na maioria dos casos, e isso resulta na diminuição da solubilidade e, conseqüentemente, muitas propriedades funcionais são destruídas ou prejudicadas por tratamentos com calor.

Muitas proteínas absorvem água e aumentam seu volume causando mudanças nas propriedades hidrodinâmicas e o "engrossamento" da substância, que se reflete no aumento da viscosidade. A viscosidade e outras propriedades reológicas usadas para escoamento são geralmente medidas em dispersões ou pastas pelo viscosímetro de Brookfield com vários tipos de cilindros rotatórios (spindles).

O conhecimento das propriedades de escoamento e viscosidade das dispersões das proteínas tem importância prática para as seguintes finalidades: projetar o processamento e processo, desenvolvimento de um novo produto, métodos e testes de controle de qualidade, entre outros. As propriedades de escoamento são influenciadas pelo tamanho e forma da molécula, solubilidade, capacidade da molécula de aumentar o seu volume. Todos esses fatores são influenciados por condições relativas ao ambiente, temperatura, concentração, pH, ionização e histórico do processamento anterior. A viscosidade pode ser um índice de mudanças estruturais ocorridas nas proteínas que sofreram alterações hidrodinâmicas [49].

A viscosidade é influenciada pela solubilidade e propriedades de intumescimento das proteínas. Proteínas altamente solúveis e incapazes de inchar, possuem baixa viscosidade. As proteínas com capacidade de intumescimento limitada mostram alta viscosidade em concentrações relativamente baixas. Logo, o intumescimento pode ser usado como um índice de viscosidade. Fatores externos que afetam a estrutura da proteína e as interações envolvidas também influem na viscosidade [49, 58].

A viscosidade representa a “resistência interna” do material, sendo medida como “resistência de escoamento” e expressa em Pascal/segundo (Pa.s). A viscosidade é influenciada pela concentração do substrato, condições de dispersão, força iônica e condições de processamento. Os líquidos Newtonianos são aqueles que seguem o postulado de Newton, ou seja, a viscosidade não varia com o stress ou força de cisalhamento [36].

A clivagem de poucas ligações peptídicas produz hidrolisados protéicos com redução de viscosidade comparada às proteínas intactas [1]. Ao contrário das proteínas, a viscosidade de soluções protéicas hidrolisadas, em geral, não é afetada pelo calor. A hidrofobicidade reduzida dos hidrolisados protéicos poderia explicar esta incapacidade em formar géis induzidos pelo calor, uma vez que a hidrofobicidade das proteínas tem sido relacionado à formação de géis termo-induzidos [57, 58].

Esta propriedade pode ser utilizada na formulação de suplementos nutricionais de alto valor energético e protéico. MAHMOUD [58] avaliou a viscosidade de um suplemento alimentar contendo nitrogênio a partir da caseína intacta e a sua substituição progressiva por caseína hidrolisada. A viscosidade do produto diminuiu em proporção logarítmica com a substituição da caseína pelo hidrolisado.

A geleificação é outra propriedade importante e pode ser definida como um fenômeno de agregação protéica na qual as forças atrativas e repulsivas estão balanceadas e formam uma rede ou matriz. Se forças atrativas predominam, um coágulo é formado e a água é expelida da matriz. Se as forças repulsivas predominam, não há formação da rede. A mudança conformacional das moléculas de proteínas é um pré-requisito para a agregação protéica, especialmente as proteínas globulares. Neste processo estão envolvidas as interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e ligações dissulfeto [36].

Os géis são caracterizados por uma viscosidade relativamente alta, plasticidade e elasticidade [26]. A habilidade da proteína para formar um gel e proporcionar uma estrutura matriz para reter água, sabores, açúcares e ingredientes alimentícios é muito usada na indústria de alimentos e no desenvolvimento de novos produtos [48, 49].

A capacidade emulsificante é uma propriedade dita surfactante, ou seja, está relacionada com a capacidade das proteínas em abaixar as tensões interfaciais entre componentes hidrofóbicos e hidrofílicos em alimentos, e essa função reflete a composição e conformação das proteínas. Uma emulsão é definida como uma dispersão ou suspensão de dois líquidos imiscíveis e podem ser do tipo água-em-óleo (margarinas e manteiga) ou óleo-em-água (leite) [36].

Os termos “estabilizantes” e “emulsificantes” são freqüentemente utilizados como similares, mas apresentam funções diferentes. Um emulsificante é um componente químico simples ou uma mistura que tem a capacidade de promover a formação da emulsão pela ação interfacial, enquanto o estabilizador é capaz de conferir estabilidade à emulsão. As proteínas podem agir como emulsificantes e estabilizadores [36].

Três diferentes métodos: capacidade emulsificante, estabilidade da emulsão e atividade emulsificante, têm sido usados na investigação das propriedades emulsificantes das proteínas. A capacidade emulsificante (CE) é o método mais comumente usado e é definida como o volume de óleo (mL) que pode ser emulsionado pela proteína (g), antes da fase de colapso da emulsão ocorrer. A estabilidade da emulsão está baseada na capacidade da proteína formar uma emulsão que não se altera sob condições específicas [48, 49].

A propriedade espumante também é uma propriedade surfactante, sendo uma importante propriedade das proteínas que consiste na capacidade das mesmas formarem espumas estáveis com o ar, propriedade muito usada em produtos alimentícios como mousses, suflês, merengues, entre outros [36, 48].

As propriedades espumantes são medidas como expansão de espuma e capacidade espumante, ambas baseadas no volume máximo que a dispersão de proteínas, cujo volume é conhecido, é capaz de atingir devido à incorporação de ar por métodos de agitação ou aeração. O poder espumante mede o aumento de volume que ocorre com a introdução de gás em uma solução ou dispersão de proteínas. Estabilidade de espuma se refere à habilidade da espuma formada em manter seu volume inalterado pelo maior período de tempo possível, isto geralmente é determinado medindo-se a quantidade de fluido perdido pela espuma [48, 49].

As espumas, quando em alimentos, devem ser estáveis e, deste modo, as proteínas formando espuma devem apresentar um balanço crítico entre a força de coesão necessária para formar uma membrana elástica estável. Para que a membrana seja formada é importante reduzir as tensões superficiais do líquido e formar membranas ao redor do vacúolo de ar [48, 49]. Para formar uma espuma eficiente, uma proteína precisa ter uma rápida adsorção na interface do sistema ar-água [36].

O uso da proteína de soja como um ingrediente funcional tem aplicação em vários tipos de alimentos processados. Na *Tabela 4* estão listadas as propriedades funcionais do IPS e os diversos sistemas alimentares onde pode ser aplicado. WOLF [97] considerou as seguintes aplicações funcionais para o isolado protéico de soja: capacidade emulsificante, estabilização, absorção de óleo, viscosidade, geleificação, formação de espuma, formação de filme, adesão, coesão, elasticidade e aeração.

**TABELA 4.** Propriedades Funcionais do Isolado Protéico de Soja (IPS) e os sistemas alimentares aplicados

<b>Propriedades funcionais do IPS</b>	<b>Sistemas alimentares</b>
Solubilidade	Bebidas
Absorção/retenção de água	Produtos cárneos, embutidos, pães, bolos
Viscosidade	Bebidas, sopas, molhos
Geleificação	Produtos cárneos, embutidos
Emulsificação	Embutidos, sopas, bolos, branqueadores de café, bebidas
Aeração	Coberturas, sobremesas
Coesão/adesão	Produtos cárneos, embutidos, produtos de panificação, massas

Fonte: WOLF [97].

As diferenças nas matérias primas e no processamento determinam as características finais das IPS. De um modo geral, as propriedades funcionais das proteínas referem-se a quaisquer propriedades química, físico-química ou física, que afetem o processamento ou determinem as funções do produto final. As propriedades funcionais refletem a completa interação entre composição, estrutura, conformação e propriedades físico-químicas das proteínas, bem como a interação destas com os outros componentes do alimento, tais como lipídeos, carboidratos e sais minerais [26].

GENOVESE & LAJOLO [33] avaliaram a obtenção de IPS a partir de três matérias primas distintas: grãos de soja normais, quebrados e fungados. Os resultados indicaram a obtenção de IPS diferentes quanto a hidrofobicidade de superfície, teor de sulfidrila livre e total, e na composição das subunidades.

MARTINS [60] comparou a produção de IPS utilizando os pHs 7,0 e 10,0 para a extração das proteínas. O autor estudou as propriedades estruturais e funcionais destas proteínas e constatou que o aumento do pH de 7,0 para 10,0 promoveu a desnaturação, com modificação progressiva das estruturas quaternárias, sem modificação significativa na solubilidade.

CHOVE *et al* [17] verificaram que as frações da IPS obtida por precipitação isoelétrica apresentavam propriedades emulsificantes (Índice de Estabilidade da Emulsão e Índice de Atividade Emulsificante) diferentes, sendo superior na fração 7S. As frações foram precipitadas nos seguintes pHs: 4,5; 5,1 e 5,6 e os melhores resultados foram obtidos pela precipitação em pH 5,1.

Os efeitos da produção de IPS sob diferentes tratamentos térmicos e respectivos hidrolisados produzidos com  $\alpha$ -quimotripsina foram avaliados por SOUZA [86]. Os resultados indicaram que o tratamento térmico não influenciou no conteúdo de fitato da IPS, mas a atividade do inibidor de tripsina e o Índice de Dispersibilidade de Proteína (IDP) diminuíram significativamente. Embora os hidrolisados apresentassem mesmo grau de hidrólise, as frações 7S e 11S do IPS nativo sofreram pequena hidrólise e o aumento da severidade do tratamento

térmico das IPSs promoveu o desaparecimento destas frações nos hidrolisados e o aparecimento de polipeptídeos com peso molecular abaixo de 14 kDa. O autor considerou esta informação importante, pois seria possível promover mudanças prévias no substrato para obter, sob as mesmas condições de hidrólise, produtos diferentes com aplicações nutricionais e tecnológicas específicas.

Muitas proteínas apresentam funcionalidade limitada e os processos de modificação física, química e enzimática são usados para expandir a faixa de propriedades funcionais disponíveis. A modificação por hidrólise enzimática de proteínas tem sido amplamente estudada, sendo a proteína de soja o substrato mais utilizado. Com exceção da solubilidade, as demais propriedades funcionais são melhores sob hidrólise limitada (10% de ligações peptídicas clivadas) [49].

As principais propriedades físico-químicas e funcionais dos hidrolisados protéicos estão listadas na *Tabela 5*. Muitas destas propriedades, como solubilidade, viscosidade, capacidade de emulsificação, formação de espuma, geleificação e atributos de flavor também estão presentes nas proteínas intactas, porém diferem destas conforme o tratamento aplicado a hidrólise [58].

A modificação enzimática promove as seguintes mudanças: i) aumento do número de grupos ionizáveis ( $\text{NH}_4^+$  e  $\text{COO}^-$ ) e carga líquida; ii) redução do peso molecular da cadeia polipeptídica com conseqüente redução da antigenicidade e iii) alteração na estrutura molecular com exposição externa dos grupos hidrofóbicos [57, 58, 62].

Além destas alterações, a presença de hidrocolóides, agentes emulsificantes, proteínas intactas e carboidratos constituem fatores importantes na funcionalidade dos hidrolisados protéicos. Em adição, a esterilização e temperaturas elevadas geralmente empregadas durante o processamento podem promover interações hidrofóbicas (peptídeo-peptídeo e peptídeo-proteína) que influenciam na estabilidade de produtos alimentícios contendo estes hidrolisados [58].

**TABELA 5.** Principais propriedades físico-químicas e funcionais de hidrolisados protéicos.

<b>Propriedades físico-químicas</b>	<b>Propriedades funcionais</b>
Peso Molecular	Alergenicidade, solubilidade, osmolalidade, viscosidade, geleificação, capacidade de emulsificação, turbidez, flavor
Superfície molecular e hidrofobicidade	Capacidade de emulsificação
Interação com carboidrato	Formação de espuma, reação de Maillard, geleificação, flavor
Interação com mineral	Solubilidade, estabilidade térmica

Fonte: MAHMOUD [58].

As propriedades funcionais dos hidrolisados protéicos determinam a escolha destes produtos para uso específico. Por exemplo, um hidrolisado hipoalergênico é um ingrediente importante no desenvolvimento de formulações infantis. Assim, a propriedade funcional pode ser seletiva para determinados ingredientes alimentares. A seguir vamos descrever as propriedades funcionais mais relacionadas aos processos de modificação enzimática.

O termo "reação adversa ao alimento" tem sido usado para descrever qualquer resposta clínica anormal, que se segue à ingestão de um alimento ou aditivo alimentar. Estas reações se dividem em reações de intolerância e de hipersensibilidade [22, 89].

As reações de intolerância representam a maioria das reações ao alimento. São ocasionados por alimentos que contenham substâncias tóxicas ou farmacológicas, contaminantes químicos, microbianos ou que causem reações idiossincráticas e/ou doenças metabólicas, ou ainda, devidas a particularidades do hospedeiro (como uma intolerância à lactose). A hipersensibilidade ao alimento ou alergia alimentar é, por definição, a consequência de uma resposta imune anormal após ingestão de um componente alimentar ou de um aditivo alimentar [22, 77].

Os principais alérgenos alimentares identificados são de natureza protéica. Muitas destas proteínas podem conter múltiplos alérgenos. Entretanto, na maioria dos casos, um ou dois destes funcionam como alérgeno principal, sendo definido como aquele alérgeno que afeta 50% ou mais dos indivíduos com alergia [92]. O leite de vaca é o alérgeno mais comum para a população infantil manifestando-se em quase 2,5% das crianças com menos de 2 anos de idade nos Estados Unidos [22]. Os alérgenos alimentares mais freqüentes estão dispostos na *Tabela 6*.

**TABELA 6.** Alérgenos alimentares mais freqüentes na população infantil e adulta.

---

**Proteínas do leite de vaca**

Caseínas

Proteínas solúveis:  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina, albumina do soro bovino, imunoglobulinas bovinas.

**Proteínas do ovo**

Ovomucóide, ovoalbumina.

**Proteínas do amendoim**

Ara h1, Ara h2, Ara h3

**Proteínas da soja**

Frações globulínicas 2S, 7S e 11S, inibidor de tripsina

**Proteínas do peixe e frutos do mar**

Gad c1 (bacalhau), Met e1 e Pen a1 (camarão), Pan s1, Hom a1 (lagosta), Cha f1 (caranguejo).

**Outras**

---

Fonte: EIGENMANN *et al* [22].

Entre as leguminosas, a soja constitui fonte alimentar de consumo crescente, representando importante fonte protéico-calórica usada na nutrição infantil. Vários alérgenos de soja foram identificados com sub-unidades de peso molecular 20 e 50-60 kDa [41] e 34 kDa [70].

TAYLOR [92] considera que o peso molecular de 10 kDa representa o limite mínimo para uma resposta imunogênica, embora pequenos peptídeos e outras moléculas possam se

ligar à peptídeos maiores e induzir à resposta haptênica. O limite superior para o peso molecular de um alérgeno pode ser ditado pela sua retenção na mucosa intestinal. FERGUSON [27] observou que a maioria dos alérgenos alimentares apresenta peso molecular na faixa de 18 a 36 kDa; enquanto TAUDORF *et al* [91] os considera na faixa de 10-50 kDa.

Outras fontes de alérgenos alimentares incluem ovos, pescados, cereais, crustáceos, moluscos, carnes, vegetais (inclusive frutas) e bebidas. Os aditivos alimentares, bactérias e fungos, e artrópodos são responsáveis pela ocorrência de uma ampla variedade de "alergias alimentares", as quais têm pouca ou nenhuma relação com a natureza do alimento [16].

As proteínas alergênicas alimentares podem ser resistentes a vários tratamentos durante o processamento, dentre os quais destacam-se o calor e pH ácido [92]. As fórmulas comerciais são geralmente esterilizadas em torno de 120°C por 10 minutos. Nestas condições, a maioria da estrutura secundária é destruída. As cadeias polipeptídicas existem primariamente como cadeias ao acaso. Durante o processamento destas fórmulas, o pH do produto é mantido neutro ou ligeiramente ácido.

DEMONTI [21] ao realizar um estudo imunoquímico sobre a fração glicinina da soja em condições nativas e submetida a variações de temperatura e pH, verificou que estes fatores, isoladamente, não indicaram alteração na antigenicidade desta fração. Em adição, a associação da temperatura 100°C e pH 2,0 reduziu a antigenicidade. O autor sugere então, que esta capacidade está primeiramente associada à configuração nativa.

A hidrólise enzimática aumenta a solubilidade no ponto isoelétrico da IPS, sendo freqüentemente usada na suplementação de bebidas contendo frutas (pH ácido). O aumento da solubilidade também é benéfico na elaboração de formulações infantis que geralmente contém outros compostos nutricionais que afetam a osmolalidade do sistema [58].

A osmolalidade é uma importante propriedade física nas formulações infantil e adulta. Soluções de elevada osmolalidade, ou seja, hipertônica ou hipermolar, podem carrear grandes quantidades de água para o intestino ocasionando diarréias severas, possível desidratação, desequilíbrio eletrolítico e também indução de náusea, vômito e distensão abdominal [56].

Osmolalidade é definida como a quantidade de partículas osmóticas ativas (em milimoles) dissolvidas em um quilograma de solvente, e tem sido expressa tradicionalmente como miliosmoles por quilograma de água (mOsm/kg H<sub>2</sub>O). Assim, a osmolalidade é proporcional ao número e peso molecular e às partículas iônicas presentes no produto [58].

Os alimentos destinados à nutrição enteral devem informar a osmolalidade, em mOsm/kg de água, do alimento pronto para uso, de acordo com a diluição recomendada. Para os alimentos com osmolalidade superior a 600 mOsm/kg H<sub>2</sub>O destinados a adultos, e superior a 460 mOsm/kg H<sub>2</sub>O destinados a crianças, deve-se alertar para os cuidados necessários à sua administração [5].

SALADO [78] avaliou a osmolalidade de uma dieta contendo hidrolisado pancreático de proteína isolada de soja com densidade calórica de 1kcal/mL e o valor obtido foi de 416 mOsm/kg H<sub>2</sub>O. A dieta apresentava 16% de proteína na forma de hidrolisado, 24% de lipídeo na forma de gordura de coco e 60% de carboidratos a partir da maltodextrina. A dieta foi administrada a pacientes desnutridos hospitalizados, os quais foram cuidadosamente monitorados. Não foram relatados sintomas de cólicas abdominais, diarreias ou vômitos em nenhum dos pacientes.

Os aminoácidos e peptídeos contribuem significativamente para o aumento da osmolalidade de formulações contendo hidrolisados protéicos. Quanto mais hidrolisada a fonte protéica maior a osmolalidade da formulação. MAHMOUD [58] demonstrou a relação linear de vários hidrolisados protéicos (caseína, soja e soro lácteo) e sua osmolalidade.

Quanto às propriedades emulsificantes, a hidrólise enzimática de proteínas, em geral, aumenta estas propriedades em situações de hidrólise controlada. ADLER-NISSEN *et al* [1] verificaram uma redução significativa da capacidade emulsificante de um hidrolisado de IPS quando o grau de hidrólise aumentou de 5 para 9%. Isto poderia ser atribuído à exposição dos grupos hidrofóbicos presentes no interior da proteína, os quais aumentam a adsorção na superfície formando um filme superficial coesivo, contendo resíduos hidrofóbicos interagindo com óleo e os resíduos hidrofílicos com a água [58].

A hidrólise extensa reduz drasticamente a capacidade emulsificante da proteína. MAHMOUD [57], ao avaliar a atividade de emulsificação da caseína durante hidrólise pancreática, demonstrou que esta atividade diminuía linearmente com o aumento do grau de hidrólise (Grau de hidrólise final = 67%). O peso molecular do hidrolisado tem uma grande influência nas propriedades emulsificantes.

A hidrofobicidade dos hidrolisados protéicos também é um fator importante que influencia suas propriedades emulsificantes. MAHMOUD [57] reportou uma forte correlação entre a atividade emulsificante e a hidrofobicidade de um hidrolisado pancreático de caseína. O autor verificou também que a especificidade da protease desempenha um papel importante na propriedade emulsificante devido à sua influência direta no tamanho e peso molecular dos peptídeos resultantes. Como exemplo, a tripsina é uma endopeptidase muito específica, que cliva as ligações peptídicas dos aminoácidos lisina e arginina. Assim, os peptídeos tripticos podem apresentar os sítios hidrofóbicos intactos com aumento de suas propriedades emulsificantes. Por outro lado, a quimotripsina quebra as ligações peptídicas dos aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina, rompendo então os sítios hidrofóbicos [58]. TURGEON *et al* [93] demonstraram que hidrolisados de soro lácteo produzido com quimotripsina apresentaram menor capacidade emulsificante que os produzidos por tripsina.

Os hidrolisados protéicos desempenham papel importante como matéria prima na formulação de dietas especiais. É necessário conhecer melhor a relação estrutura-propriedade para que se possa ter uma aplicabilidade segura do produto.

#### **4. PROPRIEDADES NUTRICIONAIS DO ISOLADO PROTÉICO DE SOJA**

Embora a função nutricional das proteínas e sua importância para a manutenção da boa saúde física e mental sejam amplamente reconhecidas, os conceitos de qualidade nutricional das proteínas têm sido largamente discutidos e modificados nos últimos anos. A soja, devido à sua ampla utilização, tem sido minuciosamente estudada.

A qualidade nutricional das proteínas depende, basicamente de sua composição em aminoácidos essenciais, digestibilidade, biodisponibilidade e ausência de toxicidade e/ou propriedades antinutricionais [82]. Os métodos para avaliar a qualidade nutricional de cada proteína podem ser agrupados em:

- a. Métodos de avaliação *in vivo*: Digestibilidade, Valor Biológico, Quociente de Eficiência Protéica (PER - Protein Efficiency Ratio), Utilização Líquida de Proteína (NPU - Net Protein Utilization), Quociente de Eficiência Líquida da Proteína (NPR - Net Protein Ratio);
- b. Métodos de avaliação *in vitro*: Escore químico de aminoácidos essenciais e Digestibilidade
- c. Combinação dos anteriores: Escore químico de aminoácidos essenciais corrigidos pela digestibilidade (= PDCAAS – Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score).

A escolha do método depende de diversos fatores: reprodutibilidade de resultados, rapidez de obtenção de resultados, custos e outros [20]. Atualmente, o método adotado pela Federal Drug and Administration (FDA) e aceito pela FAO/WHO [25] para avaliar os alimentos destinados a adultos e crianças acima de 01 ano de idade é o Escore Químico de Aminoácidos Essenciais Corrigido pela Digestibilidade (PDCAAS) [102].

Dados obtidos por HENLEY & KUSTER [38] e pela FAO/WHO [25] indicam o PDCAAS de diversos alimentos e são apresentados na *Tabela 7*. Baseado neste método, a IPS é equivalente em qualidade às proteínas de origem animal. Este método considera três parâmetros críticos da avaliação da qualidade protéica: o perfil de aminoácidos essenciais da fonte protéica; sua digestibilidade; e a capacidade de suprir os aminoácidos essenciais nas quantidades requeridas para seres humanos [38].

**TABELA 7.** Escore químico de aminoácidos essenciais corrigidos pela digestibilidade (PDCAAS) de diversas fontes protéicas.

FONTE PROTÉICA	PDCAAS	
	FAO/WHO [25]	HENLEY & KUSTER [38]
Caseína	1,00	1.00
Clara de ovo	1,00	1.00
Proteína Isolada de Soja	0,99	1.00
Carne bovina	0,92	0.92
Farinha de ervilha	0,52	0.69
Feijão em lata	-	0.68
Aveia em flocos	-	0.57
Lentilha em lata	-	0.52
Farinha de amendoim	-	0.52
Farinha de trigo integral	-	0.40
Glúten	-	0.25

SALADO [78], ao avaliar o Índice PDCAAS do IPS e seu respectivo hidrolisado pancreático, obteve 52% de adequação dos aminoácidos sulfurados para a IPS e de 45% para o hidrolisado. Além dos aminoácidos sulfurados, a treonina apresentou adequação de 83% no hidrolisado. NETTO & GALEAZZI [69] encontraram 73% de adequação para os aminoácidos sulfurados no hidrolisado pancreático de IPS. Estes valores estão de acordo com os reportados na literatura [38, 68, 81].

SALADO [78] realizou a avaliação nutricional biológica e clínica de uma dieta formulada com hidrolisado protéico de soja utilizando a pancreatina com sistema enzimático. A avaliação biológica da dieta mostrou que a mesma foi eficiente na recuperação de ratos *wistar* adultos e desnutridos, promovendo ganho de peso, balanço nitrogenado positivo, PER, VB e NPU elevados e aumento de níveis séricos de albumina, transferrina e proteínas totais. Estudos histológicos mostraram que a dieta formulada com hidrolisado protéico promoveu a

recuperação adequada tanto do fígado como do intestino dos animais, sendo comparada aos níveis de recuperação obtidos com a dieta de caseína. A utilização da dieta por indivíduos desnutridos hospitalizados demonstrou ganho de peso em 87,5% dos pacientes, manutenção dos parâmetros antropométricos e aumento moderado dos parâmetros bioquímicos.

A utilização de dietas contendo a soja como fonte protéica exclusiva tem sido avaliada por diversos autores. Ao avaliar o balanço de nitrogênio em adultos, *CARIAS et al* [15], *HENLEY & KUSTER* [38], *ISTEFAN et al* [45], *SARWAR & MACDONOUGH* [81], *TORUN et al* [92] e *YOUNG et al* [100, 101] demonstraram que a IPS poderia ser utilizada como única fonte protéica de nitrogênio e aminoácidos essenciais.

Estudos realizados em crianças, tanto saudáveis quanto desnutridas, mostraram que a soja promove o crescimento adequado dos lactentes e recuperação de crianças desnutridas com fornecimento satisfatório de energia e nutrientes essenciais [92, 100]. Hidrolisados de IPS também demonstraram sua eficácia como fonte protéica na alimentação. *MARCHINI et al* [59] demonstraram, através de métodos biológicos, a qualidade protéica de dois hidrolisados de soja produzidos pela pancreatina e neutrase, sendo os valores obtidos pelos hidrolisados superiores ao da IPS.

## **5. MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS**

O processo de modificação enzimática de proteínas para uso em alimentos surgiu na segunda guerra mundial (década de 40) através da obtenção de hidrolisados de caseína e de proteína de soja. Além de sua utilização nutricional, as proteínas também têm sido modificadas através de enzimas visando sua aplicação como ingrediente funcional. Nesta revisão descreveremos os processos de modificação enzimática através das reações de hidrólise e de plasteína.

## 5.1. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise de alimentos protéicos é realizada por várias razões incluindo melhora das características nutricionais, retardamento de deterioração, fornecimento de textura, aumento ou diminuição da solubilidade, estabilidade térmica, adição de capacidade emulsificante, prevenção de interações indesejáveis, remoção de “off-flavors” e odores, e remoção de ingredientes tóxicos ou inibidores [30, 47, 50].

Os hidrolisados protéicos têm sido recomendados principalmente nos casos de deficiência de ordem digestiva e absorptiva [2, 28]. A utilização de hidrolisados protéicos ganhou ênfase a partir dos trabalhos de SILK *et al* [84], que demonstraram a fisiologia da digestão e absorção protéica. Além das vantagens cinéticas na absorção de pequenos peptídeos em relação aos aminoácidos [29], vários trabalhos têm demonstrado o melhor desempenho nutricional além de apresentarem osmolaridade maior que os aminoácidos livres [29, 39, 59, 68, 78, 83, 103].

A hidrólise protéica pode ser realizada através de enzimas, ácidos ou álcalis. Contudo, a hidrólise enzimática é mais adequada em relação aos métodos químicos, quando a aplicação é dirigida a fins nutricionais. As hidrólises ácida e alcalina podem destruir os L-aminoácidos, produzir D-aminoácidos e ainda formar substâncias tóxicas como Lisino-alanina [82].

Os critérios de seleção mais importantes a serem considerados em hidrolisados protéicos incluem valor nutricional, custo, sabor, antigenicidade, solubilidade e funcionalidade. As proteínas mais usadas são caseína, proteínas de soro lácteo e soja. As proteases são categorizadas de acordo com a especificidade e o mecanismo pelo qual atuam. A especificidade da enzima influi na degradação dos epitópos responsáveis pelas reações imunológicas e a formação de peptídeos amargos [50].

Na hidrólise de substratos comumente usados em formulações nutricionais, especialmente caseína, se usa freqüentemente uma mistura de exo- e endopeptidases. Em geral, as enzimas purificadas não fornecem um perfil de peso molecular compatível com formulações hipoalergênicas sem o uso de ultrafiltração. Soluções enzimáticas puras também

são limitadas em sua capacidade de hidrólise. A pancreatina que é um sistema enzimático formado por uma mistura de tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina e carboxipeptidases A e B, tem ambas as atividades de endo- e exopeptidases e é muito utilizada para este fim [69].

A  $\alpha$ -quimotripsina é uma serino-protease com atividade de endoprotease alcalina que possui os aminoácidos Gly-216, Gly-226 e Ser-189 no sítio ativo. É extraída de pâncreas bovino (EC 3.4.21.2) e suíno (EC 3.4.21.2) e cliva as ligações peptídicas envolvendo os aminoácidos tirosina, fenilalanina e triptofano. A perda da atividade enzimática ocorre pela modificação do aminogruppo que pode ser obtida em pH acima de 9,0. Várias outras enzimas podem ser utilizadas para o processo de hidrólise, entre elas a tripsina, proteases de origem bacterianas, pepsina, papaína e ficina [67].

Um dos principais elementos para produção comercial destas formulações é o desenvolvimento de uma mistura ótima de enzimas, para produzir o perfil desejado de aminoácidos e peptídeos. O conhecimento e o controle do tamanho dos peptídeos nos hidrolisados é importante para o desenvolvimento de formulações infantis hipoalergênicas.

A "1ª geração" de fórmulas hipoalergênicas contendo hidrolisado de caseína foi produzida há mais de 40 anos, e é caracterizada pela composição de aminoácidos livres maior que 70 mol% e peptídeos contendo menos de 8 aminoácidos. A "2ª geração" baseada em hidrolisados de proteínas de soro lácteo, tem 40-60 mol% de aminoácidos livres e peptídeos de até 12 aminoácidos, sendo produzidas há mais de 10 anos. A "3ª geração", mais atual, também baseada em proteínas de soro lácteo, tem menos de 20% de aminoácidos livres e peptídeos de até 15 aminoácidos [50].

BRAUN [13] considera que o processo de produção de hidrolisados enzimáticos envolve primeiramente a solubilização da fonte de proteína em meio aquoso, passando por uma ação da enzima e posterior desnaturação. A peptona (ou proteína hidrolisada) sofre, então, uma filtração e clarificação, seguida de evaporação, pasteurização e secagem em Spray, levando finalmente à proteína hidrolisada em pó.

Para que o processo de hidrólise enzimática ocorra, deve haver um controle de uma série de parâmetros. Esses parâmetros são, principalmente, concentração do substrato, razão enzima-substrato, pH, temperatura e tempo de hidrólise. As condições de hidrólise são controladas para se encontrar características específicas, como distribuição de aminoácidos, de peso molecular e quantidade de proteína residual intacta. Os materiais e condições de hidrólise são também controlados levando em consideração o sabor, solubilidade e certas propriedades físicas do produto hidrolisado [2].

HENN & NETTO [40] caracterizaram 13 hidrolisados pancreáticos de diferentes isolados protéicos de soja e verificaram que os IPSs submetidos às mesmas condições de hidrólise enzimática comportaram-se como matérias-primas distintas, uma vez que houve diferenças tanto no tempo da reação de hidrólise, como nas características dos produtos obtidos.

Dentro das aplicações dos hidrolisados protéicos, CORDLE [18] observou que quando os hidrolisados são usados como alimento em pacientes selecionados, alguns benefícios clínicos podem ser obtidos, como no controle de alergias alimentares. FROKJAER [30] utilizou com eficácia hidrolisados protéicos para suplementação em necessidades especiais como em dietas para idosos, em nutrição esportiva e dietas para controle de peso.

O sabor de hidrolisados protéicos enzimáticos é normalmente caracterizado por um amargor associado ao aparecimento de peptídeos que apresentam aminoácidos hidrofóbicos volumosos no terminal carboxílico [2, 31, 71]. O grau de amargor dos aminoácidos e das cadeias peptídicas poderá ser estimado pela determinação do valor médio de hidrofobicidade  $Q$  ( $Q = \Delta F$ ), em que  $\Delta F$  é a variação na energia livre em kcal/mole, para a cadeia lateral de um aminoácido passar de uma solução alcoólica (etanol) para a água. Tem sido demonstrado que para peptídeos, valores de  $Q$  superiores a 1400 indicam peptídeos amargos. Observa-se que proteínas formadas por resíduos com alto valor de  $Q$  ( $> 1400$ ), como a soja, caseína, glúten e zeína dão origem a peptídeos amargos. Outro fator importante é o peso molecular do peptídeo, o qual apresenta sabor amargo quando inferior a 6000 Da [82].

Apesar da seleção da matéria prima ser um importante fator para a produção de hidrolisados enzimáticos, esta característica limita a utilização das principais fontes protéicas disponíveis, tais como a soja e caseína. Como o grau de amargor é um parâmetro crítico para a aplicação de hidrolisados protéicos em alimentos, vários métodos com o objetivo de remover o amargor têm sido estudados. Esses métodos incluem: separação seletiva e reação de síntese de plasteína [2, 73].

## 5.2. REAÇÃO DE SÍNTESE DE PLASTEÍNA

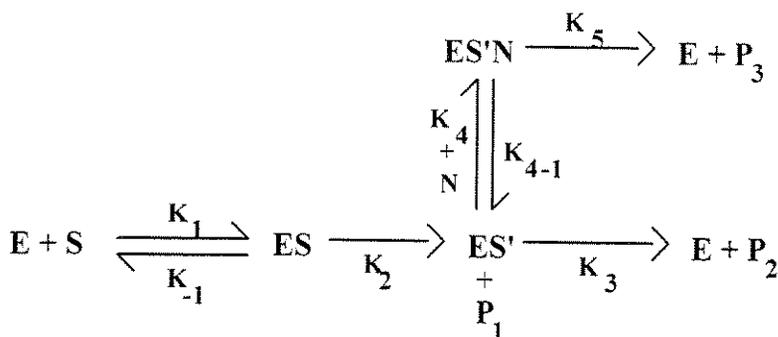
A reação de síntese de plasteína pode ser considerada um processo enzimático que ocorre de modo reverso à hidrólise usual catalisada por proteinases [8, 42, 41, 71, 94, 98]. Operacionalmente, a formação de plasteína tem sido definida como a formação de material insolúvel em solução de TCA 10%, etanol 70% ou acetona [93]. Esta reação tem sido utilizada para as proteínas de soja e, em menor grau, para caseína, ovalbumina, proteínas de soro lácteo, concentrado protéico de peixe e outras fontes protéicas não convencionais.

A reação de síntese de plasteína requer três condições que se opõem àquelas necessárias para os valores máximos de hidrólise: o substrato deve ser uma mistura de peptídeos de baixo peso molecular, preferencialmente obtidos de uma pré-hidrólise enzimática da proteína. A concentração do substrato no sistema de reação é outro fator importante na ressíntese e deve estar na faixa de 20 a 40% (p/v). A faixa ótima de pH para várias proteases para a formação da plasteína é restrita a pH 4-7 [31].

As enzimas utilizadas para a reação de formação de plasteína encontradas na literatura são, em sua maioria: pepsina, papaína, subtilisina<sup>BPN</sup>,  $\alpha$ -quimotripsina, e pancreatina, sendo as formas purificadas estudadas com maior frequência. Contudo, outros sistemas enzimáticos devem ser estudados anteriormente a fim de se estabelecer parâmetros ótimos e diferentes propriedades físico-químicas na utilização em produtos alimentares alternativos.

Embora a reação de síntese de plasteína tenha sido descrita há mais de 100 anos, os mecanismos envolvidos na reação ainda não estão completamente elucidados. Na década de 70, os alemães e japoneses publicaram diversos trabalhos envolvendo a reação de plasteína e os mecanismos envolvidos nesta reação. Neste período, a reação de plasteína foi considerada um processo reverso à hidrólise enzimática tradicional, tendo como substrato uma elevada concentração de peptídeos, os quais eram condensados resultando em um novo material protéico de alto peso molecular [7, 8, 43, 98].

ARAI & FUJIMAKI [7] consideraram que a ligação peptídica na síntese de plasteína pode ocorrer por transpeptidação e/ou condensação e que pode ser mais provável que ocorram ambas as reações com extensão variável dependendo das condições experimentais e da natureza dos peptídeos envolvidos. Durante a reação, um intermediário acil-enzima é possivelmente formado, sendo subsequente atacado por um nucleofílico em solução, conforme demonstrado na *Figura 2* [7, 35].



**FIGURA 2.** Possível mecanismo envolvido na reação de síntese de plasteína [7].

A partir da década de 80, pesquisadores propuseram outros modelos de mecanismos para a reação de plasteína. LOZANO & COMBES [55] sugeriram que o processo de transpeptidação ocorre como mecanismo primário. ANDREWS & ALICHANIDIS [4], HOFSTEN & LALASIDIS, [42] e SUKAN & ANDREWS [89] consideraram pouco provável a formação de novas ligações peptídicas e que as forças físicas, como interações hidrofóbicas e iônicas, seriam as mais importantes na reação de síntese de plasteína.

HOFSTEN & LALASIDIS [42] produziram plasteína a partir de hidrolisado enzimático de concentrado protéico de soro lácteo e concentrado protéico de peixe, utilizando proteases bacterianas de baixa especificidade. Os autores concluíram que a formação do gel na reação de síntese de plasteína pode ser descrita como um tipo de rearranjo no qual as reações de transpeptidação e hidrólise são mais importantes que as reações de condensação, e que as ligações não covalentes entre os peptídeos de peso molecular relativamente baixo são responsáveis pelas propriedades peculiares dos produtos desta reação.

SUKAN & ANDREWS [89] demonstraram que a plasteína obtida a partir de hidrolisado péptico de caseína era completamente rompida na presença de uréia 8M, ácidos orgânicos a 50% (v/v), detergentes fortemente iônicos e valores extremos de pH. O perfil de peptídeos confirmou que estes, originalmente presentes no hidrolisado, também estavam presentes na plasteína; e que o conteúdo de aminogrupos não foram alterados na formação de plasteína. Estes experimentos, adicionados aos de eletroforese em gel demonstraram que somente ligações hidrofóbicas e iônicas estavam envolvidas na formação da plasteína, não havendo sido detectada a formação de ligação peptídica ou transpeptidação. Eles ainda obtiveram maior rendimento da plasteína quando a mesma proteinase foi usada em ambos os estágios da reação e o peso molecular do substrato de 380-800 Da. Os autores sugeriram que a mistura de peptídeos usada como substrato deve evitar a presença de peptídeos de elevado peso molecular assim como de aminoácidos livres. ASO *et al* [8] e ERIKSEN & FAGERSON [24] reforçam este ponto de vista ao constatarem que os aminoácidos sob a forma livre não são incorporados à síntese de plasteína.

ANDREWS & ALICHANIDIS [4] avaliaram as propriedades da plasteína e os mecanismos de formação sendo utilizado o mesmo substrato, ou seja, hidrolisado de caseína. Eles verificaram que a reação de síntese de plasteína é um processo de agregação física, sendo necessário a presença de uma proteinase ativa para catalisar esta reação. Entretanto, a reação é independente da especificidade da enzima e pH ótimo da hidrólise. Seus resultados evidenciaram que o mecanismo primário para a formação da plasteína é via interação hidrofóbica.

LORENZEN & SCHLIMME [54], ao avaliarem as propriedades funcionais e estruturais de agregados de hidrolisados e plasteínas obtidos a partir de hidrolisado pancreático de caseína, verificaram que ambos os produtos apresentaram resultados similares. A incorporação de etil-éster de aminoácidos não é um fenômeno exclusivo da reação de síntese de plasteína. Os autores sugeriram ainda que sejam revistos os mecanismos envolvidos na reação de síntese de plasteína.

Estudos subsequentes refutaram a ressíntese como a principal causa na formação da plasteína, pois esta é termodinamicamente desfavorável e não há modificação no teor de grupos  $\alpha$ -aminínicos sob as condições de reação [67].

LOZANO & COMBES [55] investigaram a ação da  $\alpha$ -quimotripsina na síntese de plasteína usando como substrato um hidrolisado péptico de albumina bovina sérica e concluíram que a reação de síntese de plasteína é um processo enzimático e que a concentração do substrato é considerada um parâmetro crítico, ou seja, quando a concentração do substrato aumenta, a via catalítica muda de hidrólise para síntese de plasteína.

Um estudo referente à solubilidade e termoestabilidade de plasteínas obtidas a partir de duas preparações peptídicas diferentes quanto dispersibilidade obtidos de um hidrolisado de caseína foi realizado por MOZAFFAR & HAQUE [66]. Eles verificaram que o substrato composto de peptídeos dispersíveis em água apresentou melhor rendimento e funcionalidade.

BROWNSSELL *et al* [14] e WILLIAMS *et al* [96] avaliaram a aplicação da reação de síntese de plasteína na micoproteína (Quorn™) produzida pela fermentação da cepa de *Fusarium graminearum*. A pepsina mostrou-se superior às enzimas tripsina, quimotripsina, papaína e proteinase de *Streptomyces griseus*. O rendimento da plasteína não foi afetado pelo pH da reação que variou de 3,0 a 7,5, e foi incrementado pela concentração do substrato, mostrando-se superior quando esta concentração era de 43% (p/p). Foi determinada a solubilização em diversos solventes, filtração em gel (Superose 12), cromatografia de troca iônica, análise de aminoácidos e calorimetria diferencial de varredura (DSC). Os resultados consideraram a plasteína como um processo de agregação puramente física, o qual apresentou

a estrutura de um gel tixotrópico, ou seja, o comportamento do gel muda com o tempo e/ou com a força de cisalhamento.

Os mesmos autores demonstraram a preferência na utilização no mesmo sistema enzimático nas reações de hidrólise e síntese de plasteína e consideraram essencial que os estudos mostrem se a enzima retém sua atividade catalítica nas condições da reação de síntese de plasteína, pois uma mistura de peptídeos poderia ser ainda clivada durante a síntese de plasteína, formando novos aminogrupos, o que dificulta a interpretação dos mecanismos desta reação. A formação simultânea de pequenas quantidades de material de baixo e elevado peso molecular pode, em alguns casos, revelar a evidência do mecanismo de transpeptidação, o qual poderia ser igualmente explicado pela formação de material agregado acompanhado de pouca hidrólise contínua.

STEVENSON *et al* [88] utilizaram técnicas de ressonância nuclear magnética (NMR) e espectrometria de massa para avaliar os mecanismos envolvidos na síntese de plasteína de caseína utilizando exo- e endopeptidases. Eles demonstraram que podem ocorrer os quatro processos discutidos anteriormente (hidrólise, condensação, transpeptidação e agregação física) de acordo com as condições da reação. Em sistemas de pequenos peptídeos, as reações de condensação e transpeptidação ocorreram formando um produto insolúvel (precipitado), com evidente preferência dos peptídeos hidrofóbicos neste processo. Quando altos níveis de peptídeos hidrofóbicos marcados foram acrescentados ao hidrolisado de caseína também havia evidência da reação de condensação, principalmente se exopeptidases foram usadas na reação. Endopeptidases resultaram em pouca condensação ou transpeptidação. Os autores verificaram que, em presença de elevada concentração de substrato, houve a detecção de ligação covalente entre os peptídeos hidrofílicos. Alguns peptídeos de maior peso molecular presentes na mistura provavelmente inibiram a endoproteínase. Os resultados demonstraram que, em relação à cinética enzimática, as reações de condensação e transpeptidação tornam-se pequenas ou insignificantes, considerando então que a agregação física foi essencialmente significativa no processo. Com a utilização de exopeptidases, os resultados foram pouco claros sendo também detectado a reação de transpeptidação.

A estrutura da plasteína se assemelha ao das proteínas desnaturadas. Estudos de difração de raios-X sobre as plasteínas revelaram a presença de polipeptídeos lineares com cadeias "close-packed". O fato da estrutura inicial da proteína não ser restaurada na formação da plasteína pode ser confirmado pela ausência da atividade enzimática nas plasteínas obtidas de hidrolisados de pepsina e tripsina, e também pela ausência de atividade hormonal nas plasteínas obtidas de insulina. Apesar das plasteínas diferirem das proteínas iniciais na sua estrutura secundária e terciária, elas se assemelham às proteínas em muitas propriedades físico-químicas. São clivadas por várias enzimas proteolíticas, reagem com ninidrina, formam complexos com cobre e são precipitadas pelo ácido tricloroacético [11].

Géis induzidos por calor também podem ser obtidos a partir de hidrolisados parciais de isolado protéico de soja (HIPS) conforme metodologia proposta por GARCIA CHACON *et al* [32]. O melhor rendimento para a obtenção do gel foi obtido quando foram utilizadas frações peptídicas de variáveis pesos moleculares como substrato. A fração de peptídeos insolúveis não formou gel, enquanto as frações de PM maior e menor que 5.000 Da e de peptídeos hidrofóbicos formaram géis fracos, quando aquecidos isoladamente. Este produto poderia ser usado em substituição a plasteína, considerando a redução do custo (não enzimático) e obtenção em menor espaço de tempo. Em outro trabalho, os mesmos autores verificaram que o gel também apresentou maior turbidez e viscosidade e menor solubilidade que o hidrolisado inicial [37]. A formação do gel ocorreu basicamente através de interações hidrofóbicas. As melhores condições para obtenção do gel incluíram o uso da pepsina a 95°C por 30 minutos.

MARTINS [61] estudou as melhores condições para obtenção de hidrolisados pancreáticos e plasteínas produzidos a partir de IPS e caseína. Quanto à distribuição do peso molecular não houve variação significativa entre os hidrolisados e plasteínas. No entanto, o teor de aminoácidos livres diminuiu na produção de plasteína obtida tanto a partir de hidrolisado pancreático de IPS puro quanto pela mistura (1:1) de hidrolisados de IPS e caseína. Os teores de aminoácidos livres ( $\cong$  12%) foram semelhantes entre as diversas plasteínas e diferentes dos obtidos pelos hidrolisados pancreáticos de caseína (6,19%) e de IPS (16,5%). Os aminoácidos essenciais lisina, metionina, fenilalanina e triptofano foram liberados em maior grau, não sendo detectada a prolina na forma livre. A atividade do inibidor de

tripsina da IPS (42,8 UTI/mg de proteína) foi reduzida em 50,5% no hidrolisado pancreático de IPS e em 80,7% nas plasteínas. A imunogenicidade das amostras foi avaliada através de anafilaxia cutânea passiva (PCA) e apresentou resultado negativo tanto para os hidrolisados quanto para as plasteínas.

A reação de síntese de plasteína também tem sido empregada para melhorar o valor nutricional de proteínas através da incorporação de aminoácidos ou da utilização de uma mistura de peptídeos provenientes de diferentes fontes protéicas. ROSAS-ROMERO & BARATTA [76] utilizaram o concentrado protéico de folha de mandioca (CPFM) para a obtenção de plasteína com caseína na proporção 50:50 e obtiveram valores de PER e NPR similares aos observados com a dieta contendo caseína.

PELÚZIO *et al* [72] avaliaram a qualidade nutricional do isolado protéico da folha de mandioca (IPFM) combinada com a caseína (50:50) pela reação de síntese de plasteína. Houve uma melhora do valor nutricional da fonte protéica, principalmente devido ao aumento de 60% do ácido glutâmico em relação ao isolado protéico da folha de mandioca e também a tirosina que apresentou valor superior ao do padrão caseína. Os autores também verificaram uma redução de 41% da atividade do inibidor de tripsina após a reação de síntese de plasteína em relação ao IPFM.

SOUZA *et al* [87] estudaram as condições de síntese e a composição mineral de plasteínas obtidas da proteína da folha de mandioca, da soja e do soro de queijo. A plasteína demonstrou ser uma fonte de ferro, manganês, magnésio e zinco. O sobrenadante apresentou teores elevados de cobre e sódio. Os autores demonstraram que os produtos obtidos representam uma boa fonte de aminoácidos essenciais e minerais, especialmente o ferro, tanto para adultos quanto crianças após o desmame.

A influência da hidrólise enzimática e síntese de plasteína na composição aminoacídica, especialmente metionina foi avaliada na proteína de soja por BARCA *et al* [9]. As condições ótimas para a incorporação de metionina foram de pH 7,0, 3h, 0,07585 gMet/g de hidrolisado utilizando a  $\alpha$ -quimotripsina como sistema enzimático. Nestas condições houve

5% de incorporação de metionina e esta fração apresentou melhor capacidade espumante e menor capacidade emulsificante e hidrofobicidade em relação a plasteína tradicional, ou seja, não enriquecida com metionina.

JEN *et al* [46] também avaliaram as propriedades funcionais de plasteína obtida a partir de hidrolisado de proteína de soja com Alcalase e Flavourzyme em um sistema de filtração contínua durante 16h. A capacidade de absorção de umidade foi de 1,8 a 3,0 vezes maior que a proteína de soja intacta. A atividade antioxidante do hidrolisado adicionado a 2,5% no óleo de soja foi superior ao BHT adicionado ao nível de 0,1%. Também foi avaliada a antigenicidade da plasteína em relação ao hidrolisado, a qual reduziu de  $\log_2 7$  para  $< 1$ .

A atividade antioxidante da plasteína também foi avaliada por LEE *et al* [51]. Os autores estudaram os efeitos da reação de síntese de plasteína nas propriedades funcionais de extratos protéicos de peixe tipo carpa. A solubilidade em água foi aproximadamente 80% maior para os extratos, em relação às plasteínas em todas as faixas de pH testadas, embora a solubilidade tenha diminuído em pH ácido. Todos os extratos e plasteínas apresentaram atividade antioxidante superior ao tocoferol, sendo maior nas plasteínas. Os autores consideraram este resultado um efeito do aumento de aminoácidos hidrofóbicos durante a reação de síntese de plasteína.

Outra aplicação importante da síntese de plasteína tem sido sua capacidade de remoção do sabor amargo produzido em alguns hidrolisados. Isto pode ocorrer devido à presença de peptídeos com resíduos hidrofóbicos como leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, tirosina e triptofano. Nas proteínas nativas, as regiões hidrofóbicas das cadeias laterais geralmente estão na parte mais interna da molécula e não afetam o sabor do produto. Assim, o desenvolvimento do sabor amargo depende do grau de hidrólise e também da composição de aminoácidos da proteína [90].

SYNOWIECKI *et al* [90] estudaram a influência da reação de síntese de plasteína no sabor amargo de hidrolisados obtidos de eritrócitos bovino utilizando a Alcalase como sistema enzimático nas duas etapas. A reação de síntese de plasteína ocorreu com 50% de substrato, sendo composto de hidrolisado e dietil-éster de ácido glutâmico na proporção 2:1. O

hidrolisado apresentou forte sabor amargo (4,3 numa escala de 5 pontos), sendo reduzido significativamente ( $p < 0,05$ ) na plasteína, a qual apresentou valor de 2,0. Neste trabalho, os autores também verificaram que a reação de síntese de plasteína melhorou a cor do produto e não houve diferença na solubilidade do hidrolisado e plasteína.

As propriedades da plasteína dependem da extensão da degradação do hidrolisado aplicado, da natureza dos substratos, do tipo de proteinases e das condições específicas da reação que influem notadamente na composição de aminoácidos.

A aplicação da reação de plasteína em sistemas alimentares tem sido demonstrada por vários pesquisadores. Podemos destacar sua ação na redução do sabor amargo de hidrolisados protéicos, na incorporação de aminoácidos essenciais, na produção de fontes protéicas com baixo teor de fenilalanina e, mais recentemente, como agente oxidante.

O mecanismo pelo qual ocorrem estas mudanças não está esclarecido. Isto se deve, em parte, pelas diferentes condições da reação, como concentração do substrato, tipo de enzima, pH, tempo, temperatura, e também pelas técnicas utilizadas para monitorar e caracterizar esta reação. Assim, é importante que o termo “reação de plasteína” seja mais bem definido para que os mecanismos envolvidos na reação e sua aplicação tecnológica possam ser desenvolvidos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADLER-NISSEN, J., ERIKSEN, S., OLSEN, H.S. Improvement of the functionality of vegetable proteins by controlled enzymatic hydrolysis. **Qual. Plant. Foods Hum. Nutr.** v. 32, n.3/4, p. 411-23, 1983.
- [2] ADLER-NISSEN, J. **Enzymatic hydrolysis of food proteins**. Londres: Elsevier, 1986. 426p.

- [3] AL-WESALI ET AL, M., LAMBERT, N., WELHAM, T., DOMONEY, C. The influence of pea seed trypsin inhibitors on the *in vitro* digestibility of casein. **J. Sci. Food Agric.**, v. 68, n.4, p. 431-7, 1995.
- [4] ANDREWS, A.T., ALICHANIDIS, E. The plastein reaction revisited: Evidence for a purely aggregation reaction mechanism. **Food Chem.**, v. 35, n. 4, p. 243-61, 1990.
- [5] ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução N° 449, publicada DOU em 13/09/99, <http://www.anvisa.gov.br>, 20/07/02.
- [6] ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução CNNPA N° 14, de 28/06/78, <http://www.anvisa.gov.br>, 20/07/02.
- [7] ARAI, S. & FUJIMAKI, M. The plastein reaction: theoretical basis. **Ann. Nutr. Alim.**, v. 32, p. 701-7, 1978.
- [8] ASO, K., YAMASHITA, M., ARAI, S., FUJIMAKI, M. General properties of a plastein synthesized from a soybean protein hydrolysate. **Agric. Biol. Chem.**, v. 3711, p. 2505-9, 1973.
- [9] BARCA, A.M.C.; RUIZ-SALAZAR, R.A.; JARA-MARINI, M.E. Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. **J. Food Sci.**, v. 65, p. 246-53, 2000.
- [10] BARCELOS, R., BONATO, E.R., BONATO, A.L.V. **A soja no Brasil: história e estatística**. Londrina. EMBRAPA-CNPSo, Documentos 21, 1997. 61p.
- [11] BELIKOV, V.M. & GOLOLOBOV, M.Y. Plasteins, their preparation, properties, and use in nutrition. **Die Nahr.**, v. 30, p. 281-7, 1986.
- [12] BETSCHART, K., SAWADA, K. Whipping and emulsifying of soybean products. **Agric. Biol. Chem.**, v. 36, p. 719-27, 1972.

- [13] BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates. **Food Tech.**, v. 48, n. 4, p. 68-71, 1994.
- [14] BROWNSELL, V.L.; WILLIAMS, R.J.H.; ANDREWS, A.T. Application of the plastein reaction to mycoprotein: II. Plastein properties. **Food Chem.**, v. 72, p. 337-46, 2001.
- [15] CARIAS, D., CIOCCIA, A.M., HEVIA, P. Grado de concordância entre la digestibilidad de proteínas animales y vegetales medidas *in vivo* e *in vitro* y su efecto sobre el computo químico. **Arch. Latinoamer. Nutr.**, v.45, n. 2, p. 111-6, 1995.
- [16] CATSIMPOLAS, N. Immunological aspects of foods and food safety. In: Tannenbaum, S. R. **Nutritional and safety aspects of food processing**, New York, Dekker, 1979. p. 399-409.
- [17] CHOVE, B.E.; GRANDISON, A.S.; LEWIS, M.J. Emulsifying properties of soy protein isolate fractions obtained by isoelectric precipitation. **J. Sci. Food Agric.**, v.81, p. 759-63, 2001.
- [18] CORDLE, C.L. Control of food allergies using protein hydrolysates. **Food Tech.**, v. 48, n. 4, p. 72-6, 1994.
- [19] DAMODARAN, S. Functional properties. In: NAKAI, S. & MODLER, H.W. **Food proteins: properties and characterization**. Wiley-VCH, New York, 1996. p. 167-234.
- [20] DE ANGELIS, R.C. Valor nutricional das proteínas - métodos de avaliação. **Cadernos de Nutrição**, v. 10, p. 8-29, 1996.
- [21] DEMONTI, A., 1993. **Caracterização por métodos químicos e imunoquímicos da glicinina da soja (*Glycine max* L.) submetida a modificação de temperatura e pH**. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, 86p.

- [22] EIGENMANN, P.A., ZAMORA, S.A., BELLI, D.C. Alergias alimentares. **Anais Nestlé**, São Paulo. V. 60, p. 20-31, 2000.
- [23] EMBRAPA-CNPSO, **A Cultura da soja no Brasil**, Londrina/PR, 2000, CD-ROM.
- [24] ERIKSEN, S. & FAGERSON, I. The plastein reaction and its applications. **J. Food Sci.**, v. 41, p. 490-3, 1976.
- [25] FAO/WHO - Report of the joint FAO/WHO - **Protein quality evaluation**. Food and Nutrition Paper. 51 - Rome, 1991.
- [26] FARFÁN, J. A. **Química de alimentos aplicada à ciência e tecnologia de alimentos**. Ed. Unicamp, Campinas, 1990, p. 57.
- [27] FERGUNSON, A. C. Food allergy. **Progr. Food Nutr. Sci.**, v. 8, p. 77-107, 1984.
- [28] FOX, P.F., MORRISSEY, P.A., MULVIHILL, D.M. Chemical and enzymatic modification of food proteins. In: HUDSON, B.J.F. **Developments in food proteins**, v.1. London, Appl. Science Publ., 1982. p. 1-60.
- [29] FREITAS, O., PADOVANI, G.J., VILELA, L., dos SANTOS, J.E., De OLIVEIRA, J.E.D., GREENE, L.J. Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition. **J. Agric. Food Chem.**, v. 41, n. 9, p. 1432-8, 1994.
- [30] FRØKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. **Food Tech.**, v. 48, n. 4, p. 86-8, 1994.
- [31] FUJIMAKI, M., YAMASHITA, M., ARAI, S., KATO, H. Enzymatic modification of proteins in foodstuffs. Part I. Enzymatic proteolysis and plastein synthesis application for preparing bland protein like substances. **Agric. Biol. Chem.**, v. 34, p. 1325-32, 1970.
- [32] GARCIA CHACON, E.J., SATTERLEE, L.D., HANNA, M.A. Heat induced gels from partially hydrolyzed soy protein isolate. **J. Food Bioch.**, v. 14, n. 1, p. 15-29, 1990.

- [33] GENOVESE, M.I., LAJOLO, F.M. Composition and structural characteristics of isolated soy proteins from broken and damaged seeds. **J. Food Sci.**, v. 58, n. 1, p. 148-52, 157, 1993.
- [34] HAGAN, R.C., VILLOTA, R. Effects of nonprotein substances on protein hydrolysis and plastein formation. **Food Chem.**, v. 23, n. 4, p. 277-94, 1987.
- [35] HAJÓS, G. Study on reversibility of enzymatic proteolysis. **Acta Alimentar.**, v. 8, p. 85, 1979.
- [36] HALL, G.M. **Methods of testing protein functionality**. Chapman & Hall Ed., London, 1996. 265p.
- [37] HARTNETT, E.K., SATTERLEE, L.D. The formation of heat and enzyme induced (plastein) gels from pepsin - hydrolyzed soy protein isolate. **J. Food Bioch.**, v. 14, n. 1, p. 1-3, 1990.
- [38] HENLEY, E.C.; KUSTER, J.M. Protein Quality Evaluation by Protein Digestibility-Correct Amino Acid Scoring. **Food Tech.**, v. 48, n. 4, p. 74-7, 1994.
- [39] HENN, R. L. 1997. **Caracterização bioquímica e hidrólise enzimática de diferentes isolados protéicos de soja comerciais**. Dissertação (mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 128p.
- [40] HENN, R.L. & NETTO, F.M. Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, n. 8, p. 3009-15, 1998.
- [41] HERIAN, A.M., TAYLOR, S.L., BUSH, R.K. Identification of soybean allergens by immunoblotting in sera from soy-allergic adults. **Intl. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 92, p. 193-8, 1990.
- [42] HOFSTEN, B. & LALASIDIS, G. Protease-catalysed formation of plastein products and some of their properties. **J. Agric. Food Chem.**, v. 24, p. 460-5, 1976.

- [43] HOROWITZ, J. & HAUROWITZ, F. Mechanism of plastein formation. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 33, p. 231-37, 1957.
- [44] IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Tabela de Composição de Alimentos**. 4ª ed. Rio de Janeiro, 1996. 137p.
- [45] ISTEAFAN, N., MURRAY, E., JANGHORBANI, M., EVANS, W.J., YOUNG, V.R. The nutritional value of a soy protein concentrate (STAPRO-3200) for long-term protein nutritional maintenance in young men. **J. Nutr.**, v. 113, n. 12, p. 2524-34, 1983.
- [46] JEN, S.C.; DEE, C.W.; HWA, C.Y. Continuous enzymatic production of soy protein hydrolysate with specific functional properties. **J. Chin. Agric. Chem. Soc.**, v. 37, p. 360-70, 1999.
- [47] KILARA, A. Enzyme-modified protein food ingredients. **Process Bioch.**, v. 23, n. 5, p. 149-57, 1985.
- [48] KINSELA, J.E. Functional properties of proteins in foods: a survey. **CRC Critical Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 1, p. 219-81, 1976.
- [49] KINSELA, J.E., GERMAN, B., DAMODARAN, S. Physicochemical and function properties of oilseed proteins with emphasis on soy proteins. In: **New protein foods**. New York: Academic Press, 1985, v. 5.
- [50] LAHL, W.J.; BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Tech.**, v. 48, n. 4, p. 68-71, 1994.
- [51] LEE, K.T.; PARK, S.H.; LEE, S.H.; RYU, H.S. Improvement of functional properties of extracts from hydrothermal cooked fish meat by plastein reaction. **J. Kor. Soc. Food Sci. Nut.**, v. 27, p. 93-101, 1998.
- [52] LIENER, I. E. Factors affecting the nutritional quality of soya products. **J. Amer. Oil Chem. Soc.**, v. 58, n. 3, p. 406-15, 1981.

- [53] LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology and utilization**. An Aspen Ed., Maryland (USA), 1999. 477p.
- [54] LORENZEN, P.C.; SCHLIMME, E. The plastein reaction : properties in comparison with simple proteolysis. **Milchwis.**, v. 47, n. 8, p. 499-504, 1992.
- [55] LOZANO, P.; COMBES, D. Effect of alkali halides on  $\alpha$  - chymotrypsin activity in the plastein reaction. **J. Sci. Food Agric.**, v. 62, v. 3, p. 245-52, 1993.
- [56] MacBURNEY, M.M., YOUNG, L. S. Formulas. In: **Enteral and tube feeding**. Ed. ROMBEAU & CALDWELL, 1984, p. 171-98.
- [57] MAHMOUD, M.I., MALONE, W.T., CORDLE, C.T. Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. **J. Food Sci.**, v. 57, p. 1223-9, 1992.
- [58] MAHMOUD, M.I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Tech.**, v. 48, n. 4, p. 89-95, 1994.
- [59] MARCHINI, J. S., FREITAS, O., DUTRA de OLIVEIRA, J.E. Avaliação bioquímica e nutricional de dois hidrolisados enzimáticos de proteína de soja. **Ciênc. Tecnol. Alimen.**, v. 5, n. 1, p. 12-21, 1985.
- [60] MARTINS. H. 1994. **Efeito do pH de extração nas propriedades físico-químicas das proteínas isoladas de soja**. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, 68p.
- [61] MARTINS, M.T.S. 1994, **Obtenção e caracterização química e imunológica parcial de plasteína obtida a partir de isolado protéico de soja e caseína**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 96p.
- [62] MARTINS, M.T.S., GALEAZZI, M.A.M. Alergia alimentar: considerações sobre o uso de proteínas modificadas Enzimaticamente. **Cadernos de Debate**, v. IV, p. 90-5, 1996.

- [63] MELLO, P. Oleaginosa reina absoluta. **A Granja**, Porto Alegre, n. 639, p. 28-32, 2002.
- [64] MILNER, J.A. Functional foods: the US perspective. **Amer. J. Clin. Nutr.**, v. 71, n. 6S, p. 1654-59, 2000.
- [65] MIYASAKA, S., MEDINA, J.C. **A soja no Brasil**. ITAL, São Paulo, 1981, 1062p.
- [66] MOZAFFAR, Z.; HAQUE, Z.U. Casein hydrolysate. III. Some functional properties of hydrophobic peptides synthesized from hydrolysate. **Food Hydrocolloids**, v. 5, n. 6, p. 573-79, 1992.
- [67] NAGODAWITHANA, T., REED, G. **Enzymes of food processing**. Academic Press, San Diego, 1993, 480p.
- [68] NETTO, F.M. 1992, **Produção e caracterização de hidrolisado pancreático de Isolado Protéico de soja para nutrição clínica**. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 161p.
- [69] NETTO, F.M.; GALEAZZI, M.A.M. production and characterization of enzymatic hydrolysate from soy protein isolate. **Lebensm.-Wissensc. Tech.**, London, v.31, p. 624-31, 1998.
- [70] OGAWA, T.; BALDO, N.; TSUJI, H.; OKAJIMA, H.; NISHIKAWA, K.; SASAOKA, K. Investigation of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v. 37, p. 555-65, 1991.
- [71] PEDERSEN, B. Removing bitterness from protein hydrolysates. **Food Tech.**, v. 48, n. 10, p. 96-8, 1994.
- [72] PELÚZIO, M.C.G.; MIRANDA, L.C.G.; MORAES, G.H.K.; PELÚZIO, L.E. Avaliação da qualidade nutricional da proteína de folha de mandioca combinada com a caseína pela reação de síntese de plasteína. **Arch. Latinoamer. Nutr.**, v. 48, p. 311-15, 1998.

- [73] PHILIPPI, S.T. **Tabela de composição de alimentos**: suporte para decisão nutricional. ANVISA, Brasília, 2001, 133p.
- [74] REDDY, M.B., HURRELL, R.F., JULLERAT, M.A., COOK, J.D. The influence of different protein sources on phytate inhibition of nonheme-iron absorption in humans. **Amer. Clin. J. Clin. Nutr.**, v. 63, n. 2, p. 203-7, 1996.
- [75] ROBERFROID, M.B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **Amer. J. Clin. Nutr.**, v. 71, n. 6S, p. 1682-7, 2000.
- [76] ROSAS-ROMERO, A. & BARATTA, C.. Composition, functional properties, and biological evaluation of a plastein from cassava leaf protein. **Plant Foods Hum. Nutr.**, v. 37, . 85-96, 1987.
- [77] SABRÁ, A., DEL CASTILLO, R., SABRÁ, S., MADI, K. **Alergia Alimentar**. In: Temas de Pediatria., Nestlé, n. 59, 1995, 56 p.
- [78] SALADO, G.A. 1997. **Resposta nutricional de pacientes hospitalizados tratados com dieta formulada de hidrolisado protéico de soja**. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1997. 159p.
- [79] SAMRIG, Porto Alegre, Folder, 1993.
- [80] SANTISTA, São Paulo, Folder, 1998
- [81] SARWAR, G., MacDONOUGH, F.E. Evaluation of protein digestibility – corrected amino acid score method for assessing protein quality of foods. **J. Assoc. Oficial Anal. Chem.**, v. 73, n. 3, p. 347-56, 1990.
- [82] SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**. Livraria Varela, São Paulo, 1996. 517p.
- [83] SILK, D.B.A. Amino acid peptide absorption in man. In: **Peptide transport and hydrolysis**, Elsevier, North Holland, 1977, p. 15-29.

- [84] SILK, D.B.A., CHUNG, Y.C., BERGER, K.L., CONLEY, K., BEIGLER, M., SLEISENGER, M.H., SPILLER, G.A., KIM, Y.S. Comparison of oral feeding of peptide and amino acid to normal human subjects. *Gut*, v. 20, n. 2, p. 291-9, 1979.
- [85] SMITH, A.K.; CIRCLE, S.J. **Soybeans: chemistry and technology**. v. 1, AVI publishing, Connecticut, 1972. 470p.
- [86] SOUZA, A.S. **Efeito do tratamento térmico nas características de isolados protéicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2000. 108p.
- [87] SOUZA, E.C.G.; MIRANDA, L.C.G.; NAGEM, T.J.; OLIVEIRA, T.T.; COSTA, N.M.B.; QUEIROZ, M.E.L.R., NEVES, A.A.; REZENDE, J.L.M. Nutritional characterization of the plastein from the protein of manioc leaf, soybeans and cheese whey. *Ceres*, v. 47, p. 9-20, 2000.
- [88] STEVENSON, D.E.; MORGAN, K.R.; FENTON, G.A.; MORAES, G. Use of NMR and mass spectrometry to detect and quantify protease-catalysed peptide bond formation in complex mixtures. *Enzy. Microb. Tech.*, v. 25, p. 357-63, 1999.
- [89] SUKAN, G. & ANDREWS, A.T. Application to the plastein reaction to casein and skim-milk powder. *J. Dairy Res.*, v. 49, p. 265-78, 1982.
- [90] SYNOWIECKI, J.; JAGIELKA, R.; SHAHIDI, F. Preparation of hydrolysates from bovine red blood cells and their debittering following plastein reaction. *Food Chem.*, v. 57, p. 435-39, 1996.
- [91] TAUDORF, E.; BUNDGAARD, A.; HANCKE, S.; HANSEN, L.V.; PRAHL, P.; WEEKE, B. Non-hydrolysed and hydrolysed soy protein. A human immunological study. *Allergy*, v. 39, p. 203-9, 1984.
- [92] TAYLOR, S.L. Chemistry and detection of food allergens. *Food Technol.*, v. 5, p. 146-52, 1992.

- [93] TORUN, B., VITERI, F.E., YOUNG, V.R. Nutritional role of soya protein for humans. **J. Amer. Oil Chem. Soc.**, v. 58, n. 3, p. 400-6, 1981.
- [94] TURGEON, S.L., GAUTHIER, S.F., PAQUIN, P. Interfacial and emulsifying properties of whey peptide fractions obtained with a two step ultrafiltration process. **J. Agric. Food Chem.**, v. 39, p. 673-6, 1991.
- [95] WATANABE , M. & ARAI, S. The plastein reaction and its applications. In: HUDSON, B. J. F. **Developments in food proteins**. New York, Elsevier, v.6, p. 179-217, 1988.
- [96] WEINGARTNER, K.E. Processing, nutrition and utilization of soybeans. In: SING, S. R., RACHIE, K., DASCHIEL, K.E. ed. **Soybeans for the tropics: research, production and utilization**. Chichester: Wiley – Interscience Pub., p. 149-78, 1987.
- [97] WILLIAMS, R.J.H.; BROWNSSELL, V.L.; ANDREWS, A.T. Application of the plastein reaction to mycoprotein: I. Plastein synthesis. **Food Chem.**, v. 72, p. 329-35, 2001.
- [98] WOLF, W.J. Soybean proteins: their functional, chemical and physical properties. . **J. Agric. Food Chem.**, v. 18, n. 6, p. 969-76, 1970.
- [99] YAMASHITA , M., ARAI, S., FUJIMAKI, M. Plastein reaction for food protein improvement. **J. Agric. Food Chem.**, v. 24, p. 1100-4, 1976.
- [100] YEBOAH, F.K., ALLI, I., SIMPSON, B.K., KONISHI, Y., GIBBS, B.F. Tryptic fragments of phaseolin from protein isolates of *Phaseolus beans*. **Food Chem.**, v.67, n.2, p.105-12, 1999.
- [101] YOUNG, V.R., SCRIMSHAW, N.S., TORUN, B., VITERI, R. Soybean protein in human nutrition: an overview. **J. Amer. Oil Chem. Soc.**, v. 58, n. 3, p. 110-20, 1979.

- [102] YOUNG, V.R., BIER, D. PELLET, P.A. A theoretical basis for increasing current estimates of the amino acid requirements in adult man which experimental support. **Amer. J. Clin. Nutr.**, v. 50, n. 1, p. 80-92, 1989.
- [103] YOUNG, V.R. PELLET, P.A. Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. **J. Amer. Diet. Assoc.**, v. 91, n. 7, p. 828-35, 1991.
- [104] ZIEGLER,F., OLLIVIER,J.M., CYNOBER,L., MASINI,J.P., LUCAS,C.C., LEVIS,E., GIBORDEAUS, J. Efficiency of enteral nitrogen support in surgical patients: small peptides vs non-degraded proteins. **Gut**, v. 31, n. 11, p. 1277-83, 1990.

## **CAPÍTULO 2**

**Artigo a ser publicado na revista Ciência e Tecnologia de Alimentos editada pela  
Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**

## CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E NUTRICIONAL DE PLASTEÍNA PRODUZIDA A PARTIR DE HIDROLISADO PANCREÁTICO DE ISOLADO PROTÉICO DE SOJA

Myrian Thereza Serra Martins  
Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá-MT, Brasil

Maria Antonia Martins Galeazzi  
Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brasil

### RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização química da plasteína produzida a partir de hidrolisado pancreático de isolado protéico de soja (IPS). O hidrolisado de IPS foi produzido em um reator de sistema descontínuo, usando-se 5% de substrato, relação enzima/substrato 1/20, durante 6h, a 37°C, sob agitação. O grau de hidrólise, determinado através da solubilidade do nitrogênio em TCA a 10%, foi de 83,7%. A plasteína foi produzida a partir deste hidrolisado na concentração de 40% em solução aquosa, pH 7, durante 24h a 37°C, sob repouso. A produtividade da plasteína, determinada através da insolubilidade do nitrogênio em TCA a 10%, foi de 65,8%. Na caracterização química, foi verificada a distribuição dos pesos moleculares do hidrolisado e da plasteína por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e cromatografia de exclusão molecular. A SDS-PAGE não permitiu a visualização das bandas tanto no hidrolisado quanto na plasteína. A cromatografia de exclusão molecular indicou diferenças na distribuição do peso molecular do hidrolisado e plasteína. O hidrolisado apresentou 5 frações de PM na faixa de 5,4 a 66,2 kDa e a plasteína com 2 frações de PM na faixa de 9,6 e 58,7 kDa. O escore químico de aminoácidos essenciais confirmou a presença dos aminoácidos sulfurados como limitantes sendo obtido os valores de 93,2 e 96,4% para o hidrolisado e plasteína, respectivamente. A modificação enzimática através da reação de síntese de plasteína mostrou ser um processo viável na produção de matéria prima para formulações alimentares de uso em nutrição clínica e em outros sistemas, sendo necessária a suplementação de metionina quando utilizada como fonte exclusiva de proteína, especialmente para crianças.

**Palavras-chave:** plasteína, hidrólise enzimática, pancreatina, isolado protéico de soja, peso molecular, escore químico.

## SUMMARY

The objective of this research was to characterize chemically the plastein produced from a pancreatic hydrolysate of soy protein isolate (SPI). The SPI hydrolysate was obtained by an enzymatic discontinuous process in a hydrolysis reactor, with a 5% substrate concentration, an enzyme/substrate ratio of 1/20, and an incubation temperature of 37°C for 6 hours under constant stirring. The degree of hydrolysis, determined by nitrogen solubility in 10% TCA, was 83.7%. The plastein was produced from this hydrolysate with a 40% substrate (w/v) at a pH of 7 at 37°C, for 24 hours without stirring. The yield of plastein, determined through nitrogen insolubility in 10% TCA was 65.8%. The protein profile was analyzed by gel electrophoresis in polyacrylamide gel, in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) and by molecular exclusion chromatography. The SDS-PAGE did not permit the bands visualization. The molecular exclusion chromatography pointed out differences in the molecular weight (MW) profiles of the hydrolysate and plastein. The SPI hydrolysate presented 5 zones in the region between 5.4 and 66.2 kDa while plastein presented 2 zones in the MW of 9.6 and 58.7 kDa. The amino acid scoring showed that the limiting amino acids were the sulfur-containing amino acids, reference values of 93.2 and 96.4% were observed for the hydrolysate and plastein, respectively. The enzymatic modification through the plastein synthesis reaction showed to be a viable process for production of raw material in food formulation for clinical nutrition and other systems, but it should be supplemented when used exclusive source protein, specially for children products.

**Key words:** plastein, enzymatic hydrolysis, pancreatin, soy protein isolate, molecular weight, amino acid scoring.

## 1 – INTRODUÇÃO

O interesse na utilização de proteínas vegetais e seus derivados pela indústria de alimentos têm crescido nos últimos anos [61]. A soja, devido à suas qualidades nutricionais e funcionais, disponibilidade de mercado, baixo custo e desenvolvimento de tecnologia apropriada, apresenta um consumo aumentado entre os povos ocidentais [9].

A soja brasileira (subgênero *Glycine*), considerada como “soja tropical” apresenta em média de 21% de óleo e 42% de proteína no farelo. Em 2002, o Brasil foi o principal exportador do farelo, detendo 32% do mercado mundial. O mercado interno da soja concentra-se no consumo de óleo e ração animal, sendo pequeno o consumo da soja em grão e seus derivados na alimentação humana [37].

O isolado protéico de soja (IPS) é um derivado da soja amplamente utilizado pela indústria de alimentos, sendo o Brasil um grande exportador desta matéria prima [37]. O IPS é obtido a partir dos flocos ou farinha de soja desengordurada, e contém no mínimo 90% de proteína (N x 6,25) em base seca [38, 48]. Conforme a Legislação Brasileira a Proteína Isolada de Soja deve possuir no mínimo 88,0% de proteína (N x 6,25) em base seca [5].

Embora a função nutricional das proteínas e sua importância para a manutenção da boa saúde física e mental sejam reconhecidas, os conceitos de qualidade nutricional das proteínas têm sido amplamente discutidos e modificados nos últimos anos. A soja, devido à sua grande utilização, tem sido minuciosamente estudada.

A qualidade nutricional das proteínas depende basicamente de sua composição em aminoácidos essenciais, digestibilidade, biodisponibilidade e ausência de toxicidade e/ou propriedades antinutricionais [47]. A escolha do método depende de diversos fatores: reprodutibilidade de resultados, rapidez de obtenção de resultados e custos [15].

A utilização de dietas contendo a soja como fonte protéica exclusiva tem sido estudada por diversos autores. Ao avaliar o balanço de nitrogênio em adultos, CARIAS *et al* [13], HENLEY & KUSTER [24], ISTEAFAN *et al* [29], SARWAR & MACDONOUGH [45],

TORUN *et al* [55], YOUNG *et al* [62] e YOUNG & PELLET [63] demonstraram que o IPS poderia ser utilizado como única fonte protéica de nitrogênio e aminoácidos essenciais.

A modificação enzimática também pode ser empregada visando a melhoria da qualidade nutricional e funcional de uma proteína. A hidrólise protéica pode ser realizada por meio de enzimas, ácidos ou álcalis. Contudo, a hidrólise enzimática é mais adequada em relação aos métodos químicos, quando a aplicação é dirigida a fins nutricionais. Os critérios de seleção mais importantes a serem considerados em hidrolisados protéicos incluem valor nutricional, custo, sabor, antigenicidade, solubilidade e funcionalidade [32].

O sabor de hidrolisados protéicos enzimáticos é normalmente caracterizado por um amargor associado ao aparecimento de peptídeos que apresentam aminoácidos hidrofóbicos no terminal carboxílico [22]. Vários métodos têm sido estudados com o objetivo de remover este amargor, sendo os mais empregados a separação seletiva e reação de síntese de plasteína [1, 41].

A reação de síntese de plasteína pode ser considerada um processo enzimático que ocorre de modo reverso à hidrólise usual catalisada por proteinases [8, 27, 28, 57, 60]. Operacionalmente, a formação de plasteína tem sido definida como a formação de material insolúvel em solução de TCA 10%, etanol 70% ou acetona [53]. Esta reação tem sido utilizada para as proteínas de soja e, em menor grau, para caseína, ovalbumina, proteínas de soro lácteo, concentrado protéico de peixe e outras fontes protéicas não convencionais.

Embora a reação de síntese de plasteína tenha sido descrita há mais de 100 anos, os mecanismos envolvidos na reação ainda não estão completamente elucidados. Na década de 70, os alemães e japoneses publicaram diversos trabalhos envolvendo a reação de plasteína e os mecanismos envolvidos nesta reação. Neste período, a reação de plasteína foi considerada um processo reverso à hidrólise enzimática tradicional, tendo como substrato uma elevada concentração de peptídeos, os quais eram condensados resultando em um novo material protéico de alto peso molecular [7, 8, 43, 57, 60].

A partir da década de 80, pesquisadores propuseram outros modelos de mecanismos para a reação de plasteína. LOZANO & COMBES [35] sugeriram que o processo de transpetidação ocorre como mecanismo primário. ANDREWS & ALICHANIDIS [4], HOFSTEN & LALASIDIS, [27] e SUKAN & ANDREWS [53] consideraram pouco provável a formação de novas ligações peptídicas e que as forças físicas, como interações hidrofóbicas e iônicas, seriam as mais importantes na reação de síntese de plasteína.

A estrutura da plasteína se assemelha ao das proteínas desnaturadas. O fato que a estrutura inicial da proteína não é restaurada na formação da plasteína pode ser confirmado pela ausência da atividade enzimática nas plasteínas obtidas de hidrolisados de pepsina e tripsina; e também pela ausência de atividade hormonal nas plasteínas obtidas de insulina. Apesar das plasteínas diferirem das proteínas iniciais na sua estrutura secundária e terciária, elas se assemelham às proteínas em muitas propriedades físico-químicas. São clivadas por várias enzimas proteolíticas, reagem com ninidrina, formam complexos com cobre e são precipitadas pelo ácido tricloroacético [10].

As propriedades da plasteína dependem da extensão da degradação do hidrolisado aplicado, da natureza dos substratos, do tipo de proteinases e das condições específicas da reação que influem notadamente na composição de aminoácidos.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as propriedades químicas e nutricionais do isolado protéico de soja modificado através da reação de hidrólise enzimática e síntese de plasteína, utilizando a pancreatina como sistema enzimático.

## **2 – MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 – Material**

O substrato utilizado foi o Isolado Protéico de Soja Samprosoy 90-NB fornecido pela Santista Alimentos S.A. A enzima utilizada para hidrólise e síntese de plasteína foi a pancreatina de pâncreas suíno (Merck) com atividade declarada de 350 FIP/g de protease. Os

demais reagentes foram de grau analítico (p.a.) de diversas procedências. Os equipamentos usados foram específicos para cada método.

## 2.2 – Métodos

### 2.2.1 – Composição centesimal do isolado protéico de soja (IPS)

O teor de proteínas (base seca) foi determinado multiplicando-se a porcentagem de nitrogênio pelos fatores 6,25 e 5,71, sendo o nitrogênio determinado pelo método Kjeldahl (semi-micro), conforme procedimento da AOAC [6]. Os teores de Umidade e Cinzas foram determinados conforme procedimento da AOAC [6] e Lípides totais, segundo BLIGH & DYER [11]. A determinação da composição centesimal foi analisada em triplicata.

### 2.2.2 – Produção do hidrolisado pancreático de IPS

A hidrólise do IPS foi feita conforme MARTINS [36], modificado por SALADO [44] (com ajuste de pH), em sistema descontínuo. O reator enzimático (marca Tecnal) com capacidade de 10L foi projetado e adaptado para as condições de hidrólise necessárias, apresentando banho-maria com circulação de água e pá para agitação controlada (rpm). Os parâmetros da reação empregados foram: concentração de substrato a 5%, relação enzima/substrato de 1/20, ajuste de pH para 7,5 com solução de NaOH a 1N, duração de 6h, agitação de 50 rpm e temperatura de 37°C. Foram realizadas 4 repetições de 10L cada.

Para produzir o hidrolisado, a suspensão aquosa de IPS foi aquecida com água deionizada até 37°C e verificado o pH, que foi em média de 6,85. Foi acrescentado 1mg/mL de azida sódica (NaN<sub>3</sub>) como agente antimicrobiano. Em seguida, foi adicionada a pancreatina previamente dissolvida em água, feito o ajuste de pH para 7,5, e monitorado a cada hora de reação. A hidrólise foi controlada pela determinação do grau de hidrólise (GH) através da solubilidade do nitrogênio em solução de TCA a 10% no tempo 0 a após 6h, segundo método proposto por YAMASHITA *et al* [60], onde a proteína precipitada por solução de TCA a 10% foi centrifugada a 10.000 rpm durante 15 minutos, na temperatura de 4°C. O nitrogênio do

sobrenadante foi determinado pelo método Kjeldahl (semimicro), conforme procedimento da AOAC [6].

Após o período de reação, a dispersão resultante foi aquecida a 70°C por 10 minutos [39]. O hidrolisado foi resfriado até temperatura ambiente, sendo liofilizado e acondicionado em embalagens plásticas, armazenado em freezer até a realização das análises e utilização como substrato para a reação de síntese de plasteína.

### 2.2.3 – Produção da Plasteína

A reação de síntese de plasteína foi realizada conforme procedimento descrito por MARTINS [36], sendo utilizado como matéria-prima o hidrolisado pancreático de IPS (40%) em solução aquosa pH 7,0; com relação enzima/substrato de 1/20 e 1mg/mL de NaN<sub>3</sub>. A incubação ocorreu em reator marca Tecnal, com capacidade para 10L, sob repouso, a 37°C, durante 24h. A reação de síntese de plasteína foi monitorada pela determinação da produtividade ( $\alpha$ ) em solução de TCA a 10%, sendo definida como a relação de nitrogênio insolúvel em solução de TCA 10% pelo nitrogênio total [60]. Após a incubação, procedeu-se de forma semelhante ao hidrolisado. Foram realizadas 2 repetições de 2L cada.

### 2.2.4 – Determinação do peso molecular

A distribuição do peso molecular do IPS, hidrolisado pancreático e plasteína de IPS foi determinada pela eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e através da cromatografia de exclusão molecular. A SDS-PAGE foi realizada de acordo com o procedimento descrito por LAEMMLI [31] e adaptado ao método proposto por PETRUCCELLI & AÑON [43], utilizando gradiente de gel de 4 a 20%. A amostra, contendo 5mg de proteína/mL de tampão contendo 0,5M de Tris-HCl (pH 6,8), 10% de glicerol (v/v), 10% de SDS (p/v), 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v) e 0,1% de azul de bromofenol (p/v), foi aquecida a 95°C durante 4 minutos e depois resfriada. Foram aplicados 10 $\mu$ L no gel. A SDS-PAGE foi realizada num sistema de tampão contínuo de SDS-Tris-Glicina, contendo 0,025M de Tris-HCL, 0,192M de Glicina e 0,1% de SDS (p/v) em pH 8,3, durante 2 horas,

tendo no início uma amperagem média de 40mA e potência de 5W e, ao final da corrida, 18mA e 2W. Os géis foram corados e fixados por 30 minutos em solução 0,1% de Coomassie Blue R-250 (p/v) em solução de metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). Em seguida, as bandas foram descoradas com solução de metanol 40% e ácido acético 10% por 3 horas até visualização adequada. O gel foi fotografado e estocado em solução de ácido acético a 10% (v/v). A calibração do gel foi realizada com padrões de proteína da Pharmacia cujo peso molecular variou de 14,4 a 94 kDa ( $\alpha$ -lactoalbumina – 14,4kDa; inibidor de tripsina – 20,1 kDa; anidrase carbônica – 30 kDa; ovalbumina – 43 kDa; albumina bovina– 67 kDa e fosforilase b – 94 kDa).

A cromatografia de exclusão molecular foi realizada de acordo com o procedimento descrito por ANDREWS [3], utilizando o gel Sephacryl S-200, que contém dextrano e poliácridamida e é estável em pH entre 3 e 11. O gel foi equilibrado em tampão fosfato 0,05M, pH 5,8. A cromatografia foi desenvolvida em coluna XK-16/100 (Pharmacia), a uma velocidade de 1mL/min., na temperatura de 22°C. Foram coletadas frações de 3mL, sendo as proteínas detectadas pela leitura de absorvância, no comprimento de onda de 280nm, em cubetas de 1cm de caminho óptico. O volume de exclusão ( $V_o$ ) foi determinado usando Blue Dextran 2000 (1mg/mL) da Sigma. A coluna foi calibrada pela eluição de padrões de proteínas da Pharmacia, variando de 13,7 a 67 kDa (ribonuclease A bovina - 13,7 kDa; quimotripsinogênio A bovina– 25 kDa; ovalbumina – 43 kDa; albumina bovina– 67 kDa e aldolase – 158kDa).

### 2.2.5 – Escore químico de aminoácidos essenciais (EQ)

Calculado a partir do resultado do aminograma, utilizando o padrão de referência da FAO/OMS [18], segundo YOUNG & PELLET [63], sendo expresso pela seguinte fórmula:

$$EQ (\%) = \frac{\text{mg de aminoácido / g de proteína teste}}{\text{mg de aminoácido / g de proteína padrão}} \times 100$$

A análise de aminoácidos essenciais foi feita através do método de SPACKMAN *et al* [48], sendo o triptofano determinado segundo ALRED & MacDONALD [2]. A determinação foi realizada em duplicata.

### 2.2.6 – Análise estatística

As médias dos resultados obtidos foram submetidas à análise de variância e, quando diferentes, pelo teste de Tukey ao intervalo de 5% de significância [14]. Para as curvas de calibração foi utilizado o coeficiente de correlação obtido por regressão linear.

## 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 – Caracterização da matéria prima

O isolado protéico de soja pode apresentar composição centesimal variada dependendo do processamento e das condições de cultivo [46]. Assim, a padronização da matéria prima é uma característica importante para a produção de hidrolisados e plasteínas com propriedades similares.

Os resultados relativos à análise centesimal do IPS Samprosoy 90-NB encontram-se na *Tabela 1*. Para os cálculos de conversão do nitrogênio em proteína foram utilizados os fatores 6,25, que é utilizado na legislação bromatológica brasileira e também pelas indústrias de alimentos e 5,71, que é o mais adequado por representar o conteúdo nitrogenado específico da soja [48]. Os valores obtidos (90,2% para o fator 6,25 e 82,4% para o fator 5,71) estão de acordo com os recomendados pela legislação [5] e encontrados por MARTINS [36], HENN [25] e SALADO [44], todos considerando o fator de conversão de 6,25. Valores superiores de 96,9% ( $N \times 6,25$ ) em base seca foram obtidos por SOUZA [49] no IPS produzido a partir de farinha desengordurada de soja, sob diferentes temperaturas e com rendimento médio de 26,57%.

**TABELA 1.** Composição centesimal aproximada do isolado protéico de soja

Componentes (%)	Isolado Protéico de Soja – IPS <sup>1</sup>
Proteína (N x 6,25) <sup>2</sup>	90,2 ± 0,04
Proteína (N x 5,71) <sup>2</sup>	82,4 ± 0,04
Umidade	5,4 ± 0,09
Cinzas <sup>2</sup>	3,9 ± 0,05
Lipídeos <sup>2</sup>	0,7 ± 0,11

<sup>1</sup> Valores médios de 3 determinações ± desvio padrão

<sup>2</sup> Valores expressos em base seca

O conteúdo de umidade e cinzas está de acordo com encontrados por MARTINS [36], SALADO [44], HENN [25] e SOUZA [49]. Quanto ao conteúdo de lipídeos, o valor obtido está semelhante ao descrito por MARTINS [36] e SALADO [44] e abaixo dos valores encontrados por HENN [25] e SOUZA [49]. HENN & NETTO [26] avaliaram 13 IPSs comerciais de diferentes marcas e obtiveram diferentes valores quanto ao conteúdo de proteína, lipídeos, umidade e cinzas.

Conforme informações do fabricante, o IPS Samprosoy 90-NB apresenta um mínimo de 90,0% de proteína (N x 6,25, base seca), máximo de 6,0% de umidade, 0,7% de fibra bruta, 0,8% de lipídeos, 5,5% de material mineral e pH na faixa de 6,7 a 7,1. Em adição, a granulometria (retenção 100 mesh) deve ser de no máximo 10,0%. Este IPS é especialmente recomendado para a formulação de bebidas, sobremesas, alimentos infantis e substituto parcial ou total da proteína do leite.

### 3.2 - Produção do hidrolisado e plasteína

O grau de hidrólise ou índice de solubilidade em TCA a 10% foi utilizado para verificar a extensão da hidrólise protéica. Considera-se que, quanto maior o seu valor, maior o rendimento de peptídeos de baixo peso molecular [60]. NETTO [39], HAGAN & VILLOTA [23] obtiveram elevado grau de correlação entre o método de TCA a 10% e o método de TNBS proposto por ADLER-NISSEN [1]. O método da solubilidade em TCA foi escolhido

por permitir a comparação com o rendimento da plasteína, que é expresso pela insolubilidade do nitrogênio em TCA a 10%.

O hidrolisado pancreático de IPS apresentou elevado grau de hidrólise (83,7%), próximo ao valor obtido por SALADO [44], de 85,4% (com controle de pH) e inferior ao obtido por MARTINS [36], de 69,7% (sem controle de pH). Estes valores são superiores aos apresentados por NETTO [39] (21,5%), embora as condições de hidrólise tenham sido diferentes. Em relação ao controle de qualidade, é importante trabalhar com parâmetros padronizados de concentração de substrato, relação enzima/substrato, pH e temperatura para a obtenção de hidrolisados com o mesmo perfil de PM [25].

Este elevado grau de hidrólise provavelmente foi obtido devido à utilização de uma mistura de exo- e endopeptidases (pancreatina), que ainda é de baixo custo, segue o modelo da digestão fisiológica e não necessita de mudanças drásticas de pH, o que contribui para a boa osmolalidade do produto [36].

A plasteína obtida a partir do hidrolisado pancreático de IPS obteve 65,8% de produtividade avaliada através da insolubilidade do nitrogênio em solução de TCA a 10%. Este resultado é concordante com o obtido por MARTINS [36], TSAI *et al* [56] e SCHMANDKE [46], onde o rendimento da plasteína foi máximo com concentrações de substrato entre 30 e 40%. Um aspecto importante da obtenção desta plasteína é o pH 7,0 da reação de síntese, o qual foi bem próximo ao utilizado para a obtenção do hidrolisado (pH 7,5).

BROWNSELL *et al* [12] e WILLIAMS *et al* [59] avaliaram a aplicação da síntese de plasteína na micoproteína (Quorn™) produzida pela fermentação da cepa de *Fusarium graminearum*. Os autores verificaram que o rendimento da plasteína não foi afetado pelo pH da reação que variou de 3,0 a 7,5; mas foi incrementado pela concentração do substrato, mostrando-se superior quando a concentração era de 43% (p/p). SYNOWIECKI *et al* [54] obtiveram maior rendimento quando a reação de síntese de plasteína foi realizada com 50% de

hidrolisados de eritrócito bovino, utilizando a Alcalase como sistema enzimático nas duas etapas.

A utilização do mesmo sistema enzimático nas reações de hidrólise e síntese de plasteína é considerada um fator importante no controle do processo. Caso contrário, a hidrólise poderá ser favorecida mesmo, sob condições distintas e adversas. SYNOWIECKI *et al* [54] consideram essencial verificar se a enzima retém sua atividade catalítica nas condições da reação de síntese de plasteína, pois uma mistura de peptídeos poderia ser ainda clivada durante a síntese, formando novos aminogrupos, dificultando a interpretação dos mecanismos desta reação.

A formação simultânea de pequenas quantidades de material de baixo e elevado peso molecular pode, em alguns casos, revelar a evidência do mecanismo de transpetidação, o qual poderia ser igualmente explicado pela formação de material agregado, acompanhado de pouca hidrólise contínua. LOZANO & COMBES [35] verificaram que a atividade enzimática é alterada com a concentração do substrato e os valores de transpetidação/condensação diminuem quando a concentração do substrato aumenta.

A utilização de exo- e endopeptidases para avaliar os mecanismos da reação de plasteína de caseína também foi avaliada por STEVENSON *et al* [52]. Os autores utilizaram técnicas de ressonância nuclear magnética (NMR) e espectrometria de massa e demonstraram que podem ocorrer os quatro processos discutidos anteriormente (hidrólise, condensação, transpetidação e agregação física) conforme as condições da reação. Em sistemas de pequenos peptídeos, as reações de condensação e transpetidação ocorreram dando formação a um produto insolúvel (precipitado), com evidente preferência dos peptídeos hidrofóbicos neste processo. Quando altos níveis de peptídeos hidrofóbicos marcados foram acrescentados ao hidrolisado de caseína também havia evidência da reação de condensação, principalmente se exopeptidases foram usadas na reação. O uso de endopeptidases resulta em pouca condensação ou transpetidação. Os autores verificaram que, em presença de elevada concentração de substrato, houve a detecção de ligação covalente entre os peptídeos hidrofílicos e alguns peptídeos de maior peso molecular presente na mistura.

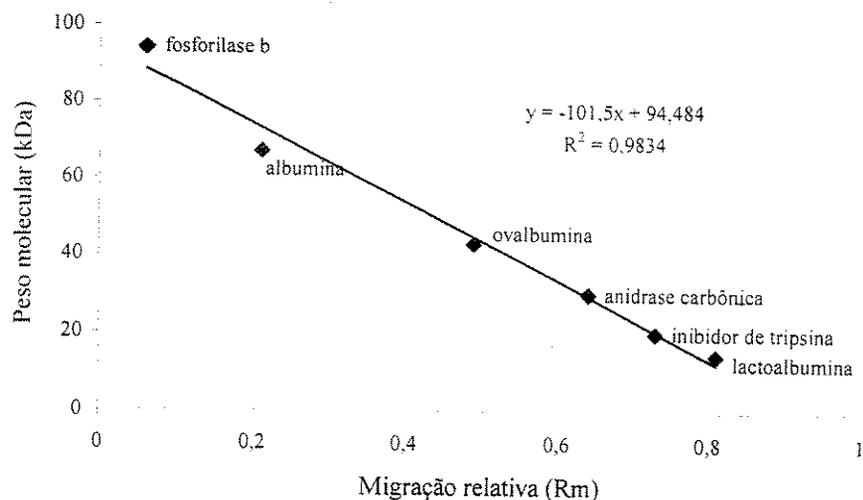
### 3.3 – Caracterização do peso molecular

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) tem sido muito utilizada para prover resolução adicional de peptídeos maiores que 5 kDa e assim, complementar os dados de distribuição de peso molecular obtidos pela cromatografia de exclusão [33]. A curva de calibração e os perfis eletroforéticos do hidrolisado e da plasteína são mostrados nas *Figuras 1 e 2*, respectivamente.

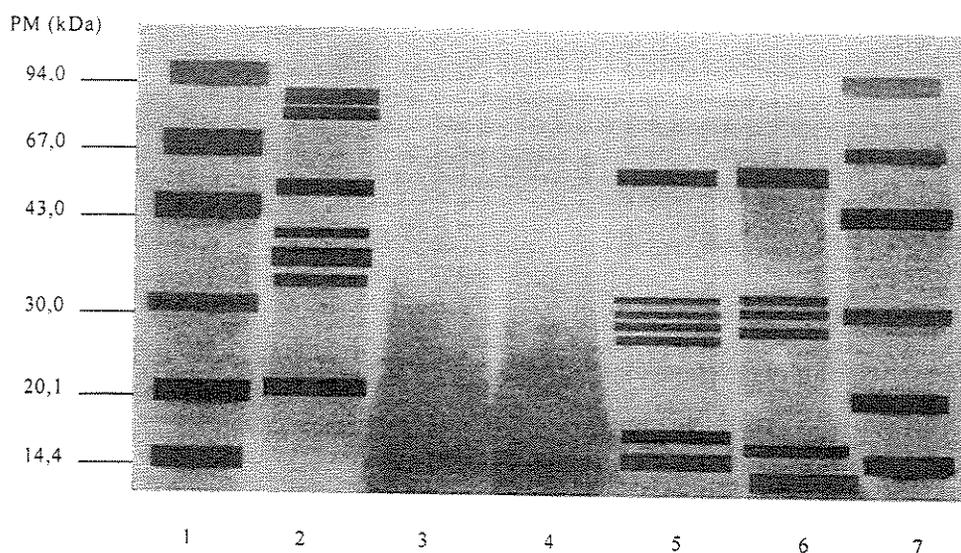
O método de SDS-PAGE com gradiente de 4 a 20% de acrilamida permitiu o monitoramento das mudanças ocorridas com a IPS submetida às reações de hidrólise e plasteína. O IPS apresentou 7 bandas com PM que variou de 20,2 a 81,4 kDa. Este resultado está de acordo com os perfis eletroforéticos apresentados por SOUZA [49] e HENN [25]. No hidrolisado pancreático e plasteína não houve a detecção de bandas, sendo verificado uma coloração mais intensa na região inferior ao PM de 28kDa. Apesar desta metodologia não ser específica para peptídeos de baixo peso molecular, verifica-se que a hidrólise foi extensa.

MARTINS [36] avaliou a SDS-PAGE do IPS, hidrolisado pancreático e plasteína de IPS em gel a 8% de acrilamida e os resultados mostraram-se diferenciados. O IPS apresentou PM variando de 14,4 a 71 kDa e não foi possível detectar bandas com PM inferior a 60kDa tanto para o hidrolisado quanto para a plasteína. Esta diferença pode ser explicada pelo maior grau de hidrólise do hidrolisado atual e também pela mudança da metodologia empregada.

A pancreatina que é um sistema enzimático formado por uma mistura de tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina e carboxipeptidases A e B, tem ambas as atividades de endo- e exopeptidases [69]. Na SDS-PAGE apresentou 7 bandas na concentração de 5mg/mL e 6 na concentração de 2,5mg/mL. O PM variou de 14,1 a 53,4 kDa e não foi detectada nenhuma banda típica da enzima nos produtos da modificação enzimática (hidrolisado e plasteína). Isto provavelmente ocorre pela baixa concentração da enzima e/ou por ter sido parcialmente utilizada como substrato da hidrólise [57].



**FIGURA 1.** Curva de calibração da eletroforese em gel de poliacrilamida (4-20%), em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A SDS-PAGE foi realizada em sistema de tampão contínuo de SDS-Tris-Glicina 0,025M e pH 8,3.



**FIGURA 2.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (4-20%), na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) da IPS, hidrolisado pancreático e plasteína de IPS. Colunas 1 e 7: Padrão; Coluna 2: IPS; Coluna 3: Hidrolisado de IPS; Coluna 4: Plasteína de IPS; Coluna 5: Pancreatina (5mg/mL) e Coluna 6: Pancreatina (2,5mg/mL).

Os resultados da SDS-PAGE estão de acordo com a sensibilidade do método e dos géis empregados. A eletroforese é importante no monitoramento das modificações ocorridas durante a ação enzimática. No entanto, na concentração do gel utilizado, esta técnica não foi eficiente para a detecção de peptídeos de baixo peso molecular.

A cromatografia de exclusão molecular é uma técnica utilizada para a determinação do peso molecular de proteínas através da correlação entre o volume do padrão eluído e seu tamanho molecular. O peso molecular (M) do hidrolisado e da plasteína foi determinado pela relação empírica proposta por WHITAKER [58], onde:

$$\text{Log}_{10} M = a + b V_e/V_o \text{ e } K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}, \text{ onde:}$$

$K_{av}$  = coeficiente de distribuição

$V_e$  = volume de eluição da proteína

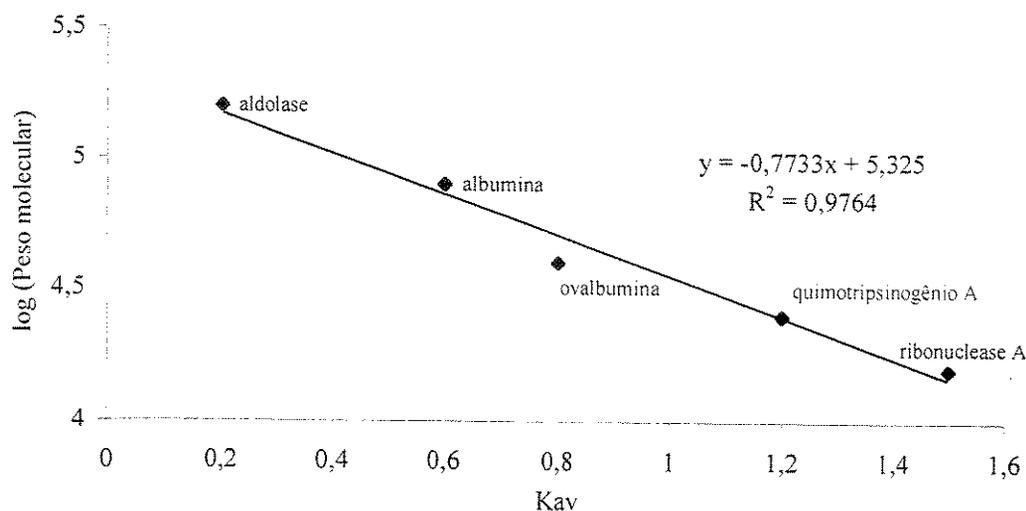
$V_o$  = volume de eluição do Blue Dextran 200 (73,0mL)

$V_t$  = volume total da coluna (186,0mL)

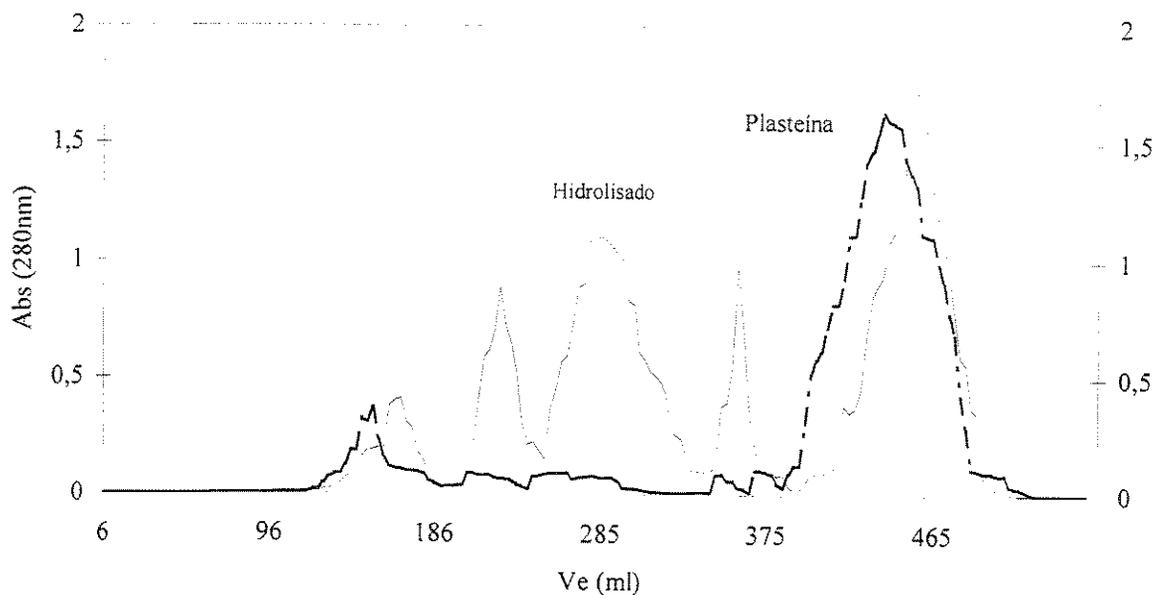
O parâmetro  $K_{av}$  (coeficiente de distribuição) representa o volume interno que é acessível para uma determinada proteína e existe uma relação linear entre os valores de  $K_{av}$  e o logaritmo do PM das proteínas [34].

A curva de calibração dos padrões moleculares em gel Sephacryl S-200 e o perfil cromatográfico do hidrolisado e plasteína estão ilustrados nas *Figuras 3 e 4*.

O hidrolisado pancreático de soja apresentou 5 frações com PM na faixa de 5,4 a 66,2 kDa, enquanto a plasteína apresentou 2 frações definidas com PM na faixa de 9,6 e 58,7 kDa. A primeira fração do hidrolisado ( $V_e = 163\text{mL}$ ) que representa 17,2% do hidrolisado e apresenta PM de 66,2 kDa; foi detectada próxima a plasteína ( $V_e = 152\text{mL}$ ) com PM de 58,7kDa e representa 15,4% da plasteína eluída. As frações 2, 3 e 4 do hidrolisado (10, 20 e 10%, respectivamente) apresentaram PM entre 14,7 e 44,3 kDa e não foram identificadas na plasteína. A 5ª fração do hidrolisado apresentou PM de 66,2 kDa enquanto na plasteína a 2ª fração apresentou PM foi de 58,7 kDa.



**FIGURA 3.** Curva de calibração dos padrões moleculares em gel Sephacryl S-200 eluído em tampão fosfato 0,05M, pH 5,8 e detectado em absorvância de 280nm.



**FIGURA 4.** Perfil da cromatografia de exclusão molecular em gel Sephacryl S-200 do hidrolisado pancreático e plasteína de IPS, eluído em tampão fosfato 0,05M, pH 5,8 e detectado em absorvância de 280nm.

Os resultados sugerem que, na plasteína, houve predominância de peptídeos baixo e alto PM, enquanto no hidrolisado houve uma melhora na sua distribuição, com frações de baixo, médio e elevado PM. Estes dados diferem da SDS-PAGE, onde não foi detectado peptídeo de elevado PM. Isto provavelmente ocorreu, porque na SDS-PAGE há o rompimento das interações não covalentes e ligação dissulfeto, enquanto na cromatografia, utilizando o tampão fosfato, não ocorre este tipo de rompimento.

A *Tabela 2* contém os valores calculados para a SDS-PAGE e cromatografia de exclusão molecular. Os valores da cromatografia de exclusão molecular são diferentes dos apresentados por MARTINS [36], que utilizou o gel Bio-Rad P60 e detectou duas frações na faixa de 45 kDa e 420 Da para o hidrolisado de IPS e 6 frações pouco definidos na faixa de 47 kDa a 350 Da para a plasteína.

**TABELA 2.** Distribuição de peso molecular (PM) do hidrolisado e plasteína de IPS obtidos através da eletroforese em gel de poliacrilamida (4-20%), na presença de dodecil sulfato de sódio de sódio (SDS-PAGE) e cromatografia de exclusão molecular em gel Sephacryl S-200, eluído em tampão fosfato 0,05M, pH 5,8.

Produto	SDS-PAGE (kDa)	Cromatografia de Exclusão Molecular (kDa)
Hidrolisado	-	66,2 – 44,3 – 29,7 – 14,7 – 5,4
Plasteína	-	58,7 – 9,6

TSAI *et al* [56] obtiveram frações de maior peso molecular na plasteína em relação ao hidrolisado e verificaram que as plasteínas produzidas com peptídeos de PM médio de 1043 e 685 Da eram mais eficientes (nitrogênio insolúvel em TCA 10%) que as frações de PM acima ou abaixo destes PMs. Foi demonstrado ainda que, quando as plasteínas obtidas destas duas frações foram submetidas a SDS-PAGE em gel 7,5%, foram detectados PM de 25 kDa, demonstrando o aumento do PM neste tipo de reação.

YAMASHITA *et al* [60] também observou a formação de peptídeos de elevado PM durante a reação de síntese de plasteína através de espectroscopia em infravermelho e uso de deutério. Outros trabalhos citados na literatura especializada têm demonstrado que a reação de síntese de plasteína é eficiente na incorporação de ésteres de aminoácidos visando a melhoria da qualidade nutricional da matéria prima [7, 22, 60].

ARAI & FUJIMAKI [7] consideram que a ligação peptídica na síntese de plasteína pode ocorrer por transpeptidação e/ou condensação e que pode ser mais provável que ocorram ambas as reações com extensão variável, dependendo das condições experimentais e da natureza dos peptídeos envolvidos.

Em oposição, SUKAN & ANDREWS [53] caracterizaram uma plasteína obtida a partir de hidrolisado péptico de caseína e o perfil dos peptídeos originalmente presentes no hidrolisado, também estavam presentes na plasteína; e que o conteúdo de aminogrupos não foram alterados na formação de plasteína. Estes experimentos, adicionados aos de eletroforese em gel mostraram que somente ligações hidrofóbicas e iônicas estão envolvidas na formação da plasteína, não tendo sido detectada formação de ligação peptídica ou transpeptidação. Eles ainda obtiveram maior rendimento da plasteína quando a mesma proteinase era usada em ambos os estágios da reação e o peso molecular do substrato era de 380-800 Da. EDWARDS & SHIPE [17] também verificaram que não houve aumento no PM da plasteína determinada através da eletroforese contendo SDS e obtida a partir de hidrolisado péptico de ovalbumina.

BROWNSELL *et al* [12] e WILLIAMS *et al* [59] avaliaram a aplicação da reação de síntese de plasteína na micoproteína (Quorn™) produzida pela fermentação da cepa de *Fusarium graminearum*. Foram utilizados várias enzimas (pepsina, tripsina, quimotripsina, papaína e proteinase de *Streptomyces griseus*) e os autores verificaram, por meio da filtração em gel (Superose 12), cromatografia de troca iônica, análise de aminoácidos e calorimetria diferencial de varredura (DSC), que a formação da plasteína é um processo de agregação física, a qual apresentou estrutura de um gel tixotrópico, ou seja, o comportamento do gel muda com o tempo e/ou com a força de cisalhamento.

STEVENSON *et al* [52] utilizaram técnicas de ressonância nuclear magnética (NMR) e espectrometria de massa para avaliar os mecanismos envolvidos na síntese de plasteína de caseína utilizando exo- e endo-peptidases. Eles demonstraram que podem ocorrer os processos de hidrólise, condensação, transpeptidação e agregação física, conforme as condições da reação. Em sistemas contendo pequenos peptídeos, as reações de condensação e transpeptidação ocorreram dando formação a um produto insolúvel (precipitado), com evidente preferência dos peptídeos hidrofóbicos neste processo.

Os trabalhos citados na literatura demonstram que a reação de síntese de plasteína é um processo no qual podem estar envolvidos diversos tipos de ligações químicas e que as características finais do produto dependem das condições da reação, da composição aminoacídica da proteína utilizada como substrato e também com as técnicas empregadas para a sua caracterização.

### **3.4 – Escore químico do IPS, Hidrolisado pancreático e plasteína**

O valor nutritivo da proteína depende principalmente de sua capacidade para satisfazer as necessidades de nitrogênio e de aminoácidos essenciais. Os requerimentos de nitrogênio e de aminoácidos são, por conseguinte, o padrão lógico pelo qual se deve medir esta capacidade na proteína. A capacidade de uma fonte de proteína satisfazer os requerimentos de aminoácidos e de nitrogênio depende não somente da composição de aminoácidos e digestibilidade da fonte ou mistura de proteínas, mas também da composição e adequação da dieta como um todo, assim como do estado fisiológico, nutricional e de saúde do consumidor [15, 63].

A *Tabela 3* mostra o escore químico dos aminoácidos essenciais do hidrolisado e plasteína de IPS comparados ao padrão FAO/OMS [19]. Os resultados demonstram que os aminoácidos sulfurados são limitantes com escore químico de 93,2 e 96,4% para o hidrolisado e a plasteína, respectivamente. Os resultados demonstram o elevado valor nutricional destas proteínas modificadas enzimaticamente, porém torna-se necessário uma suplementação dos

aminoácidos sulfurados quando estes produtos forem utilizados como fonte exclusiva de proteína.

**TABELA 3.** Escore químico de aminoácidos essenciais (EQ) do hidrolisado e plasteína de IPS.

Aminoácidos essenciais (mg/g proteína)	Fontes protéicas			EQ (%)	
	Padrão [19]	Hidrolisado	Plasteína	Hidrolisado	Plasteína
Val	3,5	4,98	5,05	142,3	144,3
Ile	2,8	4,83	3,89	172,5	138,9
Leu	7,7	8,17	8,23	106,1	106,9
Thr	3,4	3,49	3,53	102,7	103,8
Met + Cys (½)	2,5	2,33	2,41	93,2	96,4
Tyr + Phe	6,3	8,66	10,04	137,5	159,4
His	1,9	2,24	2,28	117,9	120,0
Lys	5,8	7,36	6,82	126,9	117,6
Trp	1,1	1,35	1,32	122,7	120,0

O EQ do hidrolisado de IPS foi superior ao relatado por MARTINS [36], que obteve 81,2% de adequação em relação aos aminoácidos sulfurados. O autor também avaliou o teor de aminoácidos livres na plasteína produzida pela mistura (50:50) de hidrolisados de IPS e caseína e verificou que os aminoácidos livres apresentaram uma redução de 12% na plasteína. Os aminoácidos Lys, Met, Phe e Trp foram liberados em maior proporção, não sendo detectada a prolina na forma livre.

A avaliação biológica e clínica deste hidrolisado pancreático de IPS, realizada por SALADO [44], indicou que a dieta contendo o hidrolisado foi eficiente para a recuperação de

ratos *wistar* adultos desnutridos, promovendo ganho de peso, balanço nitrogenado positivo, PER, VB e NPU elevados e ainda aumento de níveis séricos de albumina, transferrina e proteínas totais. Em adição, estudos histológicos realizados pela mesma autora mostraram que a dieta formulada com o hidrolisado protéico promoveu a recuperação adequada tanto do fígado como do intestino dos animais alimentados durante 21 dias, podendo ser comparada aos níveis de recuperação com a dieta de caseína.

NETTO [39] avaliou o efeito de uma dieta contendo hidrolisado pancreático de soja em ratos em crescimento e também verificou que esta fonte protéica é eficiente quando comparada à caseína. O autor ainda demonstrou que após 15 dias de dieta aprotéica as vilosidades do íleo apresentavam menor tamanho sendo totalmente recuperadas após 15 dias de dieta contendo o hidrolisado protéico.

BROWNSSELL *et al* [12] avaliaram a aplicação da reação de síntese de plasteína na micoproteína (Quorn) utilizando a enzima pepsina e 43% de concentração de substrato (p/p). Considerando os aminoácidos Leu, Ile, Val e Phe como mais hidrofóbicos e Asp/Asn, Glu/Gln, Lys e Arg como mais hidrofílico, a relação de aminoácidos hidrofóbico/hidrofílico foi de 24,3/34,1 no hidrolisado e de 41,3/25,1 na plasteína.

A avaliarmos a relação hidrofóbica/hidrofílica do perfil de aminoácidos do hidrolisado pancreático e plasteína de PIS conforme a descrição de BROWNSSELL *et al* [12], obtivemos os valores de 23/48 para o hidrolisado e 27/39 para a plasteína de IPS. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por SUKAN & ANDREWS [53], que verificaram a preferência pela incorporação dos aminoácidos hidrofóbicos durante a reação de síntese de plasteína obtida de hidrolisado péptico de caseína.

PELÚZIO *et al* [42], ao avaliarem a qualidade nutricional do isolado protéico da folha de mandioca (IPFM) combinada com a caseína (50:50) pela reação de síntese de plasteína, verificaram que houve uma melhora significativa no perfil de aminoácidos, principalmente em relação ao ácido glutâmico (limitante) que aumentou 60% em relação ao IPFM.

SYNOWIECKI *et al* [54] realizaram a avaliação nutricional de plasteína produzida a partir de hidrolisado de eritrócitos bovino, utilizando a enzima Alcalase e dietil éster de ácido glutâmico. Os resultados indicaram diferenças na composição aminoacídica do hidrolisado e da plasteína, onde houve a incorporação de elevadas quantidades de ácido glutâmico (26%) e menor teor de aminoácidos livres ( $1,85 \text{ mg g}^{-1}$  na plasteína e  $18,57 \text{ mg g}^{-1}$  no hidrolisado). Também foram determinados o Quociente de Eficiência protéica (PER) e o Índice de aminoácidos essenciais (EAA) dos produtos. Foram obtidos os valores de 3,7 para o PER do hidrolisado de eritrócitos bovino e de 2,2 para a plasteína e o EAA de 67,3 para o hidrolisado e de 46,0 para a plasteína. Estes resultados estão relacionados aos baixos teores de aminoácidos sulfurados e isoleucina detectados no hidrolisado e na plasteína.

SOUZA *et al* [50] estudaram a composição mineral e de aminoácidos das plasteínas obtidas da proteína da folha de mandioca, da soja e do soro de queijo. As plasteínas demonstraram ser uma boa fonte de aminoácidos essenciais, ferro, manganês, magnésio e zinco e. O sobrenadante apresentou teores elevados de cobre e sódio.

#### 4 – CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou as propriedades químicas da plasteína produzida a partir de hidrolisado de isolado protéico de soja, utilizando a pancreatina como sistema enzimático. O monitoramento da reação de hidrólise e de síntese de plasteína foi realizado através do grau de hidrólise, verificado pela solubilidade do nitrogênio em TCA 10%, e sendo de 83,7%, e pela produtividade da plasteína, avaliada pela insolubilidade do nitrogênio em TCA a 10%, e sendo de 65,8%.

O hidrolisado apresentou perfil cromatográfico com 5 frações de PM na faixa de 5,4 a 66,2 kDa e a plasteína com 2 frações de PM na faixa de 9,6 e 58,7 kDa. O hidrolisado apresentou uma distribuição mais homogênea de PM. A SDS-PAGE não permitiu a visualização das bandas tanto no hidrolisado quanto na plasteína.

O escore químico de aminoácidos essenciais confirmou a presença dos aminoácidos sulfurados como limitantes sendo obtido os valores de 93,2 e 96,4% para o hidrolisado e plasteína de IPS, respectivamente. A relação hidrofóbica/hidrofílica do perfil de aminoácidos foi de 23/48 para o hidrolisado e de 27/39 para a plasteína, caracterizando o caráter mais hidrofóbico da plasteína em relação ao hidrolisado.

A modificação enzimática através da reação de hidrólise e de síntese de plasteína mostrou ser um processo viável na produção de matéria prima para ser aplicada em formulações de uso em nutrição clínica e em outros sistemas alimentares onde é necessário o uso de peptídeos de peso molecular variado. No entanto, torna-se necessária a suplementação de metionina quando utilizada como fonte exclusiva de proteína, especialmente para crianças.

## 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADLER-NISSEN, J. **Enzymatic hydrolysis of food proteins**. London, Elsevier, 1986. 426p.
- [2] ALRED, M.C. & MacDONALD, J.L. Determination of sulfur amino acids and tryptophan in foods feeds ingredients: collaborative studies. **J. Assoc. Offic. Analyt. Chem.**, v.71, n.3, p.603-6, 1988.
- [3] ANDREWS, A.T. Protein analysis by electrophoresis: recent developments. In: HUDSON, B.J.F. **Developments in food proteins**, v 6. London, Elsevier, p.219-58, 1988.
- [4] ANDREWS, A.T., ALICHANIDIS, E. The plastein reaction revisited: Evidence for a purely aggregation reaction mechanism. **Food Chem.**, v. 35, n. 4, p. 243-61, 1990.
- [5] ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução N° 449, publicada DOU em 13/09/99, <http://www.anvisa.gov.br>, 20/07/02.

- [6] A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12 ed. Washington, 1990.
- [7] ARAI, S. & FUJIMAKI, M. The plastein reaction: theoretical basis. **Ann. Nutr. Alim.**, v. 32, p. 701-7, 1978.
- [8] ASO, K., YAMASHITA, M., ARAI, S., FUJIMAKI, M. General properties of a plastein synthesized from a soybean protein hydrolysate. **Agric. Biol. Chem.**, v. 3711, p. 2505-9, 1973.
- [9] BARCELOS, R., BONATO, E.R., BONATO, A.L.V. **A soja no Brasil: história e estatística**. Londrina. EMBRAPA-CNPSo, Documentos 21, 1997. 61p.
- [10] BELIKOV, V.M. & GOLOLOBOV, M.Y. Plasteins, their preparation, properties, and use in nutrition. **Die Nahr.**, v. 30, p. 281-7, 1986.
- [11] BLIGH, E. G. & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, 37: 911-7, 1959.
- [12] BROWNSSELL, V.L.; WILLIAMS, R.J.H.; ANDREWS, A.T. Application of the plastein reaction to mycoprotein: II. Plastein properties. **Food Chem.**, v. 72, p. 337-46, 2001.
- [13] CARIAS, D., CIOCCIA, A.M., HEVIA, P. Grado de concordância entre la digestibilidad de proteínas animales y vegetales medidas *in vivo* e *in vitro* y su efecto sobre el computo químico. **Arch. Latinoamer. Nutr.**, v.45, n. 2, p. 111-6, 1995.
- [14] COCKRAN, W.G. & COX, G.M. Experimental design. 2ed. New York: John Wiley, 1957, 611p.
- [15] DE ANGELIS, R.C. Valor nutricional das proteínas - métodos de avaliação. **Cadernos de Nutrição**, v. 10, p. 8-29, 1996.

- [16] DILLON, J.C. Les methodes dévaluation de la valeur nutritive des proteins en alimentation humaine – La method recement recomendée par OMS/FAO. **Les Cash. Nutr. Diet.**, v.27, n.1, p. 224-9, 1992.
- [17] EDWARDS, J.H. & SHIPE, W.F. Characterization of plastein products formed by pepsin,  $\alpha$ -quimotripsin, and papain treatment of egg albumin hydrolysates. **J. Food Sci.**, v. 43, p. 1215-18, 1978.
- [18] ERIKSEN, S. & FAGERSON, I. The plastein reaction and its applications. **J. Food Sci.**, v. 41, p. 490-3, 1976.
- [19] FAO/WHO - Report of the joint FAO/WHO - **Protein quality evaluation**. Food and Nutrition Paper. 51 - Rome, 1991.
- [20] FREITAS, O., PADOVANI, G.J., VILELA, L., dos SANTOS, J.E., De OLIVEIRA, J.E.D., GREENE, L.J. Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition. **J. Agric. Food Chem.**, v. 41, n. 9, p. 1432-8, 1994.
- [21] FRØKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. **Food Tech.**, v. 48, n. 4, p. 86-8, 1994.
- [22] FUJIMAKI, M., YAMASHITA, M., ARAI, S., KATO, H. Enzymatic modification of proteins in foodstuffs. Part I. Enzymatic proteolysis and plastein synthesis application for preparing bland protein like substances. **Agric. Biol. Chem.**, v. 34, p. 1325-32, 1970.
- [23] HAGAN, R.C., VILLOTA, R. Effects of nonprotein substances on protein hydrolysis and plastein formation. **Food Chem.**, v. 23, n. 4, p. 277-94, 1987.
- [24] HENLEY, E.C.; KUSTER, J.M. Protein Quality Evaluation by Protein Digestibility-Correct Amino Acid Scoring. **Food Tech.**, v. 48, n. 4, p. 74-7, 1994.

- [25] HENN, R. L. 1997. **Caracterização bioquímica e hidrólise enzimática de diferentes isolados protéicos de soja comerciais**. Dissertação (mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 128p.
- [26] HENN, R.L. & NETTO, F.M. Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, n. 8, p. 3009-15, 1998.
- [27] HOFSTEN, B. & LALASIDIS, G. Protease-catalysed formation of plastein products and some of their properties. **J. Agric. Food Chem.**, v. 24, p. 460-5, 1976.
- [28] HOROWITZ, J. & HAUROWITZ, F. Mechanism of plastein formation. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 33, p. 231-37, 1957.
- [29] ISTEFAN, N., MURRAY, E., JANGHORBANI, M., EVANS, W.J., YOUNG, V.R. The nutritional value of a soy protein concentrate (Stapro-3200) for long-term protein nutritional maintenance in young men. **J. Nutr.**, v. 113, n. 12, p. 2524-34, 1983.
- [30] KILARA, A. Enzyme-modified protein food ingredients. **Process Bioch.**, v. 23, n. 5, p. 149-57, 1985.
- [31] LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p.680-85, 1970.
- [32] LAHL, W.J.; BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Tech.**, v. 48, n. 4, p. 68-71, 1994.
- [33] LEARY, H. L. Nonclinical testing of formulas containig hydrolyzed milk protein. **J. Pediatr.**, **121**: S42-6, 1992.
- [34] LI-CHAN, E. Separation and purification. In: **Food proteins: properties and characterization**. New York, Wiley-VCH, p. 429-503, 1996.

- [35] LOZANO, P.; COMBES, D. Effect of alkali halides on  $\alpha$  - chymotrypsin activity in the plastein reaction. **J. Sci. Food Agric.**, v. 62, n. 3, p. 245-52, 1993.
- [36] MARTINS, M.T.S. 1994, **Obtenção e caracterização química e imunológica parcial de plasteína obtida a partir de isolado protéico de soja e caseína**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 96p.
- [37] MELLO, P. Oleaginosa reina absoluta. **A Granja**, Porto Alegre, n. 639, p. 28-32, 2002.
- [38] MIYASAKA, S., MEDINA, J.C. **A soja no Brasil**. ITAL, São Paulo, 1981, 1062p.
- [39] NETTO, F.M. 1992, **Produção e caracterização de hidrolisado pancreático de Isolado Protéico de soja para nutrição clínica**. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 161p.
- [40] NETTO, F.M.; GALEAZZI, M.A.M. production and characterization of enzymatic hydrolysate from soy protein isolate. **Lebensm.-Wissensch. Tech.**, London, v.31, p. 624-31, 1998.
- [41] PEDERSEN, B. Removing bitterness from protein hydrolysates. **Food Tech.**, v. 48, n. 10, p. 96-8, 1994.
- [42] PELÚZIO, M.C.G.; MIRANDA, L.C.G.; MORAES, G.H.K.; PELÚZIO, L.E. Avaliação da qualidade nutricional da proteína de folha de mandioca combinada com a caseína pela reação de síntese de plasteína. **Arch. Latinoamer. Nutr.**, v. 48, p. 311-15, 1998.
- [43] PETRUCCELLI, S. & ANÓN, M.C. Thermal aggregation of soy protein isolates. **J. Agric. Food Chem.**, v.43, n. 12, p. 3035-41, 1995.
- [44] SALADO, G.A. 1997. **Resposta nutricional de pacientes hospitalizados tratados com dieta formulada de hidrolisado protéico de soja**. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1997. 159p.

- [45] SARWAR, G., MacDONOUGH, F.E. Evaluation of protein digestibility – corrected amino acid score method for assessing protein quality of foods. **J. Assoc. Official Anal. Chem.**, v. 73, n. 3, p. 347-56, 1990.
- [46] SCHMANDKE, H. Die Plasteinsynthese als eine Möglichkeit zur Modifizierung funktioneller Eigenschaften von Protein. **Die Nahr.**, 20: 567-73, 1976.
- [47] SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**. Livraria Varela, São Paulo, 1996. 517p.
- [48] SMITH, A.K.; CIRCLE, S.J. **Soybeans: chemistry and technology**. v. 1, AVI publishing, Connecticut, 1972. 470p.
- [49] SOUZA, A.S. **Efeito do tratamento térmico nas características de isolados protéicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2000. 108p.
- [50] SOUZA, E.C.G.; MIRANDA, L.C.G.; NAGEM, T.J.; OLIVEIRA, T.T.; COSTA, N.M.B.; QUEIROZ, M.E.L.R., NEVES, A.A.; REZENDE, J.L.M. Nutritional characterization of the plastein from the protein of manioc leaf, soybeans and cheese whey. **Ceres**, v. 47, p. 9-20, 2000.
- [51] SPACKMAN, D. H.; STEIN, H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analyt. Chem.**, v. 30, n.9, p. 1190-1206, 1958.
- [52] STEVENSON, D.E.; MORGAN, K.R.; FENTON, G.A.; MORAES, G. Use of NMR and mass spectrometry to detect and quantify protease-catalysed peptide bond formation in complex mixtures. **Enzy. Microb. Tech.**, v. 25, p. 357-63, 1999.
- [53] SUKAN, G. & ANDREWS, A.T. Application to the plastein reaction to casein and skim-milk powder. **J. Dairy Res.**, v. 49, p. 265-78, 1982.

- [54] SYNOWIECKI, J.; JAGIELKA, R.; SHAHIDI, F. Preparation of hydrolysates from bovine red blood cells and their debittering following plastein reaction. **Food Chem.**, v. 57, p. 435-39, 1996.
- [55] TORUN, B., VITERI, F.E., YOUNG, V.R. Nutritional role of soya protein for humans. **J. Amer. Oil Chem. Soc.**, v. 58, n. 3, p. 400-6, 1981.
- [56] TSAI, S.; YAMASHITA, M.; ARAI, S.; FUJIMAKI, M. Polyacrilamide gel electrophoresis of plasteins. **Agric. Biol. Chem.**, **38**: 641-4, 1974.
- [57] WATANABE, M. & ARAI, S. The plastein reaction and its applications. In: HUDSON, B. J. F. **Developments in food proteins**. New York, Elsevier, v.6, p. 179-217, 1988.
- [58] WHITAKER, J.R. Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on sephadex. **Anal. Chem.**, v. 35, p. 1950-53, 1963.
- [59] WILLIAMS, R.J.H.; BROWNSSELL, V.L.; ANDREWS, A.T. Application of the plastein reaction to mycoprotein: I. Plastein synthesis. **Food Chem.**, v. 72, p. 329-35, 2001.
- [60] YAMASHITA, M., ARAI, S., FUJIMAKI, M. Plastein reaction for food protein improvement. **J. Agric. Food Chem.**, v. 24, p. 1100-4, 1976.
- [61] YEBOAH, F.K., ALLI, I., SIMPSON, B.K., KONISHI, Y., GIBBS, B.F. Tryptic fragments of phaseolin from protein isolates of *Phaseolus beans*. **Food Chem.**, v. 67, n.2, p.105-12, 1999.
- [62] YOUNG, V.R., BIER, D. PELLET, P.A. A theoretical basis for increasing current estimates of the amino acid requirements in adult man which experimental support. **Amer. J. Clin. Nutr.**, v. 50, n. 1, p. 80-92, 1989.
- [63] YOUNG, V.R. PELLET, P.A. Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. **J. Amer. Diet. Assoc.**, v. 91, n. 7, p. 828-35, 1991.

## **CAPÍTULO 3**

**Artigo a ser publicado na revista Ciência e Tecnologia de Alimentos editada pela  
Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**

## PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE PLASTEÍNA PRODUZIDA A PARTIR DE HIDROLISADO PANCREÁTICO DE ISOLADO PROTÉICO DE SOJA

Myrian Thereza Serra Martins  
Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá-MT, Brasil

Maria Antonia Martins Galeazzi  
Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, Brasil

### RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar as propriedades funcionais da plasteína e do hidrolisado de isolado protéico de soja (IPS) produzidos com pancreatina. A solubilidade em água destilada, solução tampão fosfato 10mM e solução de ácido acético 50% (v/v) foi igual e em torno de 86% para o IPS, 93% para o hidrolisado e 92% para a plasteína. Em solução de SDS 0,3M, não houve diferença significativa, enquanto que em solução de TCA 10%, a solubilidade diferiu entre as amostras, sendo maior no hidrolisado (82,90%), seguido pela plasteína (35,08%) e IPS (21,43%). A capacidade emulsificante foi maior no IPS, seguido pela plasteína e hidrolisado e foi maior em água do que em solução de NaCl 0,5M, em todos os produtos avaliados. A modificação enzimática também promoveu um aumento da capacidade espumante, sendo maior na plasteína (46,6%), quando comparada ao hidrolisado (40,0%) e IPS (13,3%). Houve diferença entre a viscosidade do IPS, hidrolisado e plasteína, somente quando as amostras foram submetidas à rotação de 100 rpm (3,9; 4,5 e 5,2 cP, respectivamente). A osmolalidade do hidrolisado foi de 328 mOsm/KgH<sub>2</sub>O e da plasteína de 342 mOsm/KgH<sub>2</sub>O, não havendo diferença significativa entre eles. O sabor apresentou valores médios de 1,8 para o IPS; 3,7 para o hidrolisado e 2,9 para a plasteína, numa escala de 5 pontos, sendo que a menor nota se refere ao produto menos amargo. A reação de síntese de plasteína mostrou ser uma alternativa viável na utilização de produtos alimentares para diversos fins, e em especial, bebidas com ampla variação de pH, concentração e condições de rotação controlada (100 rpm).

**Palavras-chave:** plasteína, propriedade funcional, isolado protéico de soja, hidrólise enzimática, pancreatina.

## SUMMARY

The objective of this research was to characterize functionally plastein produced from pancreatic hydrolysate of soy protein isolate (SPI) produced with pancreatin. The solubility was modified by medium dissolution of protein sources, being approximately 86% for the SPI, 93% for the hydrolysate and 92% for the plastein in water, 10 mM sodium phosphate buffer and 50% acetic acid (v/v). In 0,3M SDS there has been no difference among the SPI, hydrolysate and plastein, whereas that in 10% TCA the solubility differed in the hydrolysate (82,9%), plastein (35.08%) and SPI (21.43%). The emulsifying capacity was analysed in water and 0,5M NaCl. It was greater in SPI followed by hydrolysate and plastein. This capacity was higher in water than in 0,5M NaCl for all the products analyzed. The enzymatic modification resulted in a higher foam capacity. The foam capacity of plastein was higher (46.6%) than that of the hydrolysate (40%) and SPI (13.3%). The syneresis was proportional that the foam capacity and bigger in plastein (36.0%). The viscosity decreased with the enzymatic modification process and with the increase of rotation used. There has been difference among the SPI, hydrolysate and plastein when submitted to 100 rpm (3.9; 4.5 and 5.2 cP, respectively). However, from 150 rpm, the viscosity decreased and no difference was found. This behavior showed that either hydrolysate or the plastein of SPI might be considered thixotropic gel. The osmolarities of the hydrolysate and the plastein were 328 and 342 mOsm/kgH<sub>2</sub>O, respectively. The taste scores of SPI, hydrolysate and plastein were 1.8; 3.7 and 2.9, respectively, on a scale of 5 points. The smaller score refers to the less bitter product. These results suggest that the plastein reaction is a viable alternative in the use of food products for several purposes, in special beverages with a large pH range, concentration and controlled rotation conditions (100 rpm) variation.

**Key words:** Plastein, functional properties, soy protein isolate, enzymatic hydrolysis, pancreatin.

## 1 – INTRODUÇÃO

As proteínas vegetais têm sido amplamente pesquisadas e utilizadas na alimentação humana. A soja destaca-se pelo seu grande volume de produção e pelo seu elevado valor nutricional. Quando comparado às outras fontes vegetais seu custo é o mais baixo, sendo o Brasil grande exportador de farelo e isolado protéico [22].

O Isolado Protéico de Soja (IPS) é obtido a partir dos flocos ou farinha de soja desengordurada, resultante da extração de óleo, e contém, geralmente, um mínimo de 90% de proteína (N x 6,25) em base seca [30]. Conforme a Legislação Brasileira, o IPS deve possuir no mínimo 88,0% de proteína (N x 6,25) em base seca [3].

O IPS pode sofrer modificação de natureza química, térmica ou enzimática conforme o produto desejado. O processo de extração da proteína influencia na solubilidade, viscosidade, geleificação, capacidade de emulsificação e estabilização da mesma. A modificação enzimática de proteínas tem sido amplamente estudada, sendo a proteína de soja um dos substratos mais utilizados [15].

A modificação por hidrólise enzimática promove as seguintes mudanças: i) aumento do número de grupos ionizáveis ( $\text{NH}_4^+$  e  $\text{COO}^-$ ); ii) redução do peso molecular da cadeia polipeptídica; e iii) alteração na estrutura molecular com exposição externa dos grupos hidrofóbicos [19, 20, 26]. Este processo pode ser usado para modificar e/ou melhorar as propriedades funcionais da proteína.

A funcionalidade é definida como qualquer propriedade de um alimento ou ingrediente alimentar, exceto a nutricional, que influencia na sua utilização. Atualmente, o termo “alimento funcional” tem sido empregado com um significado fisiológico, como sinônimo de “alimentos nutracêuticos”, ou seja, alimentos que causam benefícios à saúde além de suas características nutricionais [10].

As propriedades funcionais tecnológicas de proteínas modificadas podem ser controladas pela escolha das enzimas. A pepsina,  $\alpha$ -quimotripsina, tripsina e pancreatina têm

sido as mais utilizadas para obtenção de hidrolisados com características funcionais mais desejáveis [8, 37].

A hidrólise enzimática aumenta a solubilidade no ponto isoelétrico do IPS, sendo freqüentemente usado na suplementação de bebidas contendo frutas (pH ácido). O aumento da solubilidade também é benéfico na elaboração de formulações alimentares destinadas às crianças, que geralmente contém outros compostos nutricionais que afetam a osmolalidade do sistema [20].

NETTO & GALEAZZI [25] avaliaram a influência da concentração do substrato e da enzima no grau de hidrólise, na solubilidade e na produção de peptídeos de baixo peso molecular, de um hidrolisado de IPS produzido com pancreatina. Os autores verificaram que o aumento da relação enzima/substrato promove um aumento na solubilidade e na produção de peptídeos de baixo peso molecular. No entanto, a concentração da enzima não influenciou o grau de hidrólise. Resultados semelhantes foram obtidos por MUTILANGI *et al* [23], ao utilizar isolado protéico de soro de queijo como substrato.

Com exceção da solubilidade, as demais propriedades funcionais são melhoradas em condições de hidrólise limitada (5 a 10% de ligações peptídicas clivadas) [1, 16, 20]. Muitas destas propriedades, como solubilidade, viscosidade, capacidade de emulsificação, formação de espuma, geleificação e atributos de flavor também estão presentes nas proteínas intactas, porém diferem destas conforme o grau de hidrólise [20].

A osmolalidade é uma importante propriedade física nas formulações alimentares para crianças e adultos. Soluções de elevada osmolalidade, ou seja, hipertônicas, podem carrear grandes quantidades de água para o intestino ocasionando diarreias severas, possível desidratação, desequilíbrio eletrolítico e também indução de náusea, vômito e distensão abdominal [18]. Os aminoácidos e peptídeos contribuem significativamente para a osmolalidade de formulações contendo hidrolisados protéicos. Quanto mais hidrolisada a fonte protéica maior será a osmolalidade da formulação. MAHMOUD [20] demonstrou uma relação linear de vários hidrolisados protéicos (caseína, soja e soro lácteo) e sua osmolalidade.

A hidrólise enzimática de proteínas, em geral, aumenta as propriedades emulsificantes em situações de hidrólise limitada. ADLER-NISSEN [1] verificou uma redução significativa da capacidade emulsificante de um hidrolisado de IPS quando o grau de hidrólise aumentou de 5 para 9%. MAHMOUD [20], ao avaliar a capacidade de emulsificação da caseína durante hidrólise pancreática, demonstrou que esta atividade diminuía com o aumento do grau de hidrólise (Grau de hidrólise final = 67%). Verificou também que a especificidade da protease desempenha um papel importante na propriedade emulsificante, devido à sua influência direta no tamanho e peso molecular dos peptídeos resultantes.

Outro processo de modificação enzimática que pode alterar a funcionalidade protéica é a reação de síntese de plasteína [5, 34, 37]. Embora esta reação tenha sido descrita há mais de 100 anos, os mecanismos envolvidos ainda não estão completamente elucidados. Na década de 70, os alemães e japoneses publicaram diversos trabalhos, e a reação de plasteína foi considerada um processo reverso à hidrólise enzimática tradicional, tendo como substrato uma elevada concentração de peptídeos, os quais eram condensados resultando em um novo material protéico de alto peso molecular [5, 6, 32, 34].

A partir da década de 80, pesquisadores propuseram outros modelos de mecanismos para a reação de plasteína. ANDREWS & ALICHANIDIS [2], HOFSTEN & LALASIDIS [12] e SUKAN & ANDREWS [31] consideraram pouco provável a formação de novas ligações peptídicas e que forças físicas, como interações hidrofóbicas e iônicas, seriam as mais importantes na reação de síntese de plasteína.

A estrutura da plasteína se assemelha ao das proteínas desnaturadas. Estudos de difração de raios-X revelaram a presença de polipeptídeos lineares com cadeias "close-packed". Apesar das plasteínas diferirem das proteínas iniciais em sua estrutura secundária e terciária, elas se assemelham às proteínas em muitas propriedades físico-químicas. Elas são clivadas por várias enzimas proteolíticas, reagem com ninidrina, formam complexos com cobre e são precipitadas pelo ácido tricloroacético [6].

A reação de síntese de plasteína tem sido empregada para a redução do sabor amargo de hidrolisados enzimáticos. SYNOWIECKI *et al* [32] estudaram a influência da reação de

síntese de plasteína no sabor amargo de hidrolisados obtidos de eritrócitos bovino utilizando a Alcalase como sistema enzimático nas duas etapas. A reação de síntese de plasteína ocorreu com 50% de substrato, sendo composto de hidrolisado e dietil-éster de ácido glutâmico. O hidrolisado apresentou forte sabor amargo (4,3 numa escala de 5,0 pontos), sendo reduzido significativamente na plasteína, a qual apresentou valor de 2,0. Neste trabalho, os autores também verificaram que a reação de síntese de plasteína melhorou a cor do produto e não houve diferença da solubilidade do hidrolisado e da plasteína.

JEN *et al* [14] também avaliaram as propriedades funcionais de plasteína obtida a partir de hidrolisado de proteína de soja com Alcalase e Flavourzyme em um sistema de filtração contínua durante 16h. A capacidade de absorção de umidade foi de 1,8 a 3,0 vezes mais que a proteína de soja intacta. A atividade antioxidante do hidrolisado adicionado a 2,5% no óleo de soja foi superior ao BHT adicionado ao nível de 0,1%. A atividade antioxidante da plasteína também foi avaliada por LEE *et al* [17]. Todos os extratos de peixe e plasteínas apresentaram atividade antioxidante superior ao tocoferol, sendo maior nas plasteínas.

As propriedades da plasteína dependem da extensão da degradação do hidrolisado, da natureza dos substratos, do tipo de proteinases e das condições específicas da reação, as quais influem notadamente na composição de aminoácidos. A aplicação da reação de plasteína em sistemas alimentares tem sido demonstrada por vários pesquisadores. Podemos destacar sua ação na redução do sabor amargo de hidrolisados protéicos, na incorporação de aminoácidos essenciais, na produção de fontes protéicas com baixo teor de fenilalanina e, mais recentemente, como agente oxidante.

O objetivo do presente trabalho foi de avaliar as propriedades funcionais da plasteína e do hidrolisado de isolado protéico de soja (IPS), utilizando a pancreatina como sistema enzimático, visando sua aplicação tecnológica.

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – Material

O substrato utilizado foi o Isolado Protéico de Soja Samprosoy 90-NB fornecido pela Santista Alimentos S.A. A enzima utilizada para hidrólise e síntese de plasteína foi a pancreatina de pâncreas suíno (Merck) com atividade declarada de 350 FIP/g de protease. Os demais reagentes foram de grau analítico (p.a.) de diversas procedências. Os equipamentos usados foram específicos para cada método.

### 2.2 – Métodos

#### 2.2.1 – Produção do hidrolisado pancreático de IPS

A hidrólise do IPS foi feita conforme MARTINS [21], modificado por SALADO [28] (com ajuste de pH), em sistema descontínuo. O reator enzimático (marca Tecnal) com capacidade de 10L foi projetado e adaptado para as condições de hidrólise necessárias, apresentando banho-maria com circulação de água e pá para agitação controlada (rpm). Os parâmetros da reação empregados foram: concentração de substrato a 5%, relação enzima/substrato de 1/20, ajuste de pH para 7,5 com solução de NaOH a 1N, duração de 6h, agitação de 50 rpm e temperatura de 37°C. Foram realizadas 4 repetições de 10L cada.

Para produzir o hidrolisado, a suspensão aquosa de IPS foi aquecida com água deionizada até 37°C e verificado o pH, que foi em média de 6,85. Foi acrescentado 1mg/mL de azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) como agente antimicrobiano. Em seguida, foi adicionada a pancreatina previamente dissolvida em água, feito o ajuste de pH para 7,5, e monitorado a cada hora de reação. A hidrólise foi controlada pela determinação do grau de hidrólise (GH) através da solubilidade do nitrogênio em solução de TCA a 10% no tempo 0 a após 6h, segundo método proposto por YAMASHITA *et al* [35], onde a proteína precipitada por solução de TCA a 10% foi centrifugada a 10.000 rpm durante 15 minutos, na temperatura de 4°C. O nitrogênio do sobrenadante foi determinado pelo método Kjeldahl (semimicro), conforme procedimento da AOAC [4].

Após o período de reação, a dispersão resultante foi aquecida a 70°C por 10 minutos [27]. O hidrolisado foi resfriado até temperatura ambiente, sendo liofilizado e acondicionado em embalagens plásticas, armazenado em freezer até a realização das análises e utilização como substrato para a reação de síntese de plasteína.

### 2.2.2 – Produção da Plasteína

A reação de síntese de plasteína foi realizada conforme procedimento descrito por MARTINS [21], sendo utilizado como matéria-prima o hidrolisado pancreático de IPS (40%) em solução aquosa pH 7,0; com relação enzima/substrato de 1/20 e 1mg/mL de  $\text{NaN}_3$ . A incubação ocorreu em reator marca Tecnal, com capacidade para 10L, sob repouso, a 37°C, durante 24h. A reação de síntese de plasteína foi monitorada pela determinação da produtividade ( $\alpha$ ) em solução de TCA a 10%, sendo definida como a relação de nitrogênio insolúvel em solução de TCA 10% pelo nitrogênio total [35]. Após a incubação, procedeu-se de forma semelhante ao hidrolisado. Foram realizadas 2 repetições de 2L cada.

### 2.2.3 – Propriedades funcionais

A solubilidade do nitrogênio do IPS, hidrolisado e plasteína de IPS foi determinada segundo o método proposto por HARTNETT & SATTERLEE [11]. Foram utilizados 2mg/mL de cada amostra e 5 sistemas de dissolução: água destilada, tampão fosfato de sódio 10mM, ácido tricloroacético (TCA) a 10%, ácido acético 50% (v/v) e dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,3M. O conteúdo de nitrogênio foi determinado pelo método Kjeldahl (semimicro), conforme procedimento da AOAC [4]. A solubilidade do nitrogênio (SN) foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{SN} = \frac{\text{Nitrogênio solúvel}}{\text{Nitrogênio total}} \times 100$$

A viscosidade foi determinada de acordo com o procedimento descrito por HARTNETT & SATTERLEE [11], sendo utilizado um viscosímetro de Brookfield DV3 com spindler N° 18 em diferentes rotações (máximo de 250 rpm). O IPS, hidrolisado e plasteína de

IPS, na concentração de 10% (p/v) permaneceram 1 minuto em cada rotação e as medidas foram realizadas a 25°C.

A osmolalidade foi determinada em leitura direta em osmômetro (Advanced® Wide-Range 3WII) e foi determinada diluindo o produto para obter a densidade calórica de 1,0kcal/mL.

A capacidade emulsificante foi determinada segundo metodologia proposta por YASUMATSU [36]. Emulsões contendo 2,5,e 5,0% foram diluídas em água destilada e solução de NaCl 0,5M pH 7,0 (ajustado com HCl). Após adição de 50mL de óleo de soja, as amostras são homogeneizadas e centrifugadas a 1300g durante 5 minutos. A altura da emulsão e a altura do óleo foram medidas à temperatura ambiente, sendo a capacidade emulsificante expressa em mL de óleo/100mL de emulsão.

A determinação da capacidade espumante foi realizada segundo HSU *et al* [13], utilizando 3% (p/v) de amostra. Este método relaciona o volume final ( $V_{fo}$ ) e o volume líquido inicial ( $V_{li}$ ) conforme a expressão:

$$CE = \frac{V_{fo} - V_{li}}{V_{li}} \times 100$$

A estabilidade da espuma foi avaliada através da sinérese, ou seja, do volume do líquido que drena da espuma. Esta é referida como estabilidade do líquido da espuma (ELE) e foi calculada de acordo com HARTNETT & SATTERLEE [11], conforme a expressão:

$$ELE = \frac{V_{li} - V_{lt}}{V_{li} - V_{lo}} \times 100, \text{ onde}$$

$V_{li}$  = volume inicial da amostra

$V_{lt}$  = volume do líquido no tempo  $t$

$V_{lo}$  = volume do líquido após a formação da espuma

A avaliação do sabor foi realizada de acordo com o procedimento descrito por SYNOWIECKI *et al* [32] utilizando-se soluções aquosas contendo 20% das amostras IPS, hidrolisado e plasteína. O teste foi conduzido com uma equipe de seis provadores treinados

utilizando uma escala de 5 pontos (1-não amargo, 2-pouco amargo, 3-amargo, 4-muito amargo e 5-fortemente amargo).

#### 2.2.4 – Análise estatística

Todas as propriedades funcionais foram realizadas em triplicata. As médias dos resultados obtidos foram submetidas à análise de variância e, quando diferentes, pelo teste de Tukey ao intervalo de 5% de significância [9].

### 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 – Caracterização do hidrolisado e plasteína

O hidrolisado pancreático de IPS apresentou grau de hidrólise de 83,7%, sendo este resultado de acordo com o obtido por SALADO [28] de 85,35% (com controle de pH) e superior ao obtido por MARTINS [21], de 69,7% (sem controle de pH). Estes valores são superiores aos reportados por NETTO [24] (32,9%), embora as condições de hidrólise tenham sido diferentes. Este grau de hidrólise é elevado e permite a utilização de uma mistura enzimática de exo- e endopeptidases de baixo custo, que imita o modelo da digestão fisiológica.

A plasteína obtida a partir do hidrolisado com pancreatina de IPS apresentou 65,8% de rendimento, avaliado através da insolubilidade do nitrogênio em solução de TCA a 10%. Este resultado é concordante ao obtido por MARTINS [21], TSAI *et al* [34] e SCHMANDKE [29], onde o rendimento da plasteína foi máximo com concentrações de substrato entre 30 e 40%. Um aspecto importante da obtenção da plasteína é que o pH foi 7,0, muito próximo ao utilizado para a obtenção do hidrolisado.

#### 3.2 - Propriedades funcionais do hidrolisado e plasteína

A solubilidade de uma proteína pode ser expressa matematicamente como a quantidade de proteína presente na fase líquida, em relação à quantidade total de proteína da fase sólido-

líquido em equilíbrio. Tecnicamente, entretanto, a solubilidade protéica é um parâmetro operacional determinado pela retenção de proteína em um sobrenadante após centrifugação de uma solução por um dado tempo e força centrífuga. A solubilidade é influenciada pelos seguintes fatores: pH, temperatura, força iônica, concentração de proteína e a presença de outros componentes [10].

Diferentes termos são usados na literatura para expressar a solubilidade da proteína. O termo dispersibilidade, comumente usado pela indústria de produtos lácteos, é uma propriedade que descreve a distribuição uniforme de um pó em água e é um critério diferente da solubilidade. O Índice de Solubilidade de Nitrogênio (ISN) foi originalmente desenvolvido para proteínas de soja e é o mais utilizado para avaliar a funcionalidade de proteínas em geral [10].

De acordo com BETSCHART [7], a solubilidade da maioria das proteínas diminui com o aumento da concentração destas, assim como com a aplicação de forças mais intensas ou centrifugações mais longas. A precipitação das proteínas pelo calor causa denaturação irreversível na maioria dos casos, e isso resulta na diminuição da solubilidade e, conseqüentemente, muitas propriedades funcionais são eliminadas ou prejudicadas por tratamentos térmicos.

A solubilidade do IPS, hidrolisado e plasteína, apresentada na *Tabela 1*, mostra que interações de diferentes tipos podem estar envolvidas na produção de hidrolisados enzimáticos e reação de plasteína. O meio de dissolução influenciou na solubilidade das fontes protéicas, sendo igual em água destilada, solução tampão fosfato 10mM e em solução de ácido acético 50% (v/v). Houve uma forte correlação de solubilidade entre estes meios, sendo obtidos os valores de  $r = 0,9927$  entre a água destilada e solução tampão fosfato 10mM;  $r = 0,9989$  entre a água destilada e a solução de ácido acético 50% (v/v); e de  $r = 0,9974$  entre a solução tampão fosfato 10mM e a solução de ácido acético 50% (v/v). Nestes meios, a solubilidade do hidrolisado e plasteína foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) que do IPS, sendo em torno de 86% para o IPS, 93% para o hidrolisado e de 92% para a plasteína.

**TABELA 1.** Solubilidade do Nitrogênio (%) do IPS, hidrolisado e plasteína, utilizando 2mg/mL de proteína<sup>1,2</sup>.

Soluções	IPS	Hidrolisado	Plasteína
Água destilada	86,02 ± 0,85 <sup>a</sup>	93,38 ± 0,36 <sup>c</sup>	92,53 ± 0,56 <sup>c</sup>
Solução Tampão fosfato 10mM	85,87 ± 0,69 <sup>a</sup>	92,89 ± 0,49 <sup>c</sup>	91,24 ± 0,19 <sup>c</sup>
Solução de TCA 10%	21,43 ± 0,44 <sup>b</sup>	82,90 ± 0,95 <sup>d</sup>	35,08 ± 0,75 <sup>e</sup>
Solução de Ácido acético 50% (v/v)	87,01 ± 0,87 <sup>a</sup>	93,56 ± 0,23 <sup>c</sup>	92,48 ± 0,51 <sup>c</sup>
Solução de Dodecil sulfato de sódio 0,3M	91,54 ± 0,29 <sup>c</sup>	92,78 ± 0,44 <sup>c</sup>	92,07 ± 0,24 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> Valores médios de 2 repetições. Cada repetição foi analisada em triplicata (± desvio padrão).

<sup>2</sup> Valores com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os resultados foram diferentes para a solubilidade em solução de TCA 10% e SDS 0,3M. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a solubilidade do IPS, hidrolisado e plasteína dispersos em solução de SDS 0,3M. Isto mostra o provável rompimento das diversas interações envolvidas no IPS nativas e modificadas enzimaticamente. Como não houve diferença de solubilidade em SDS do hidrolisado e plasteína, podemos considerar que a plasteína produzida no presente trabalho é constituída por agregados físicos, sem o aumento do peso molecular dos peptídeos através de ligações covalentes. Este resultado está de acordo aos citados na literatura por ANDREWS & ALICHANIDIS [2], HOFSTEN & LALASIDIS [12], SUKAN & ANDREWS [31] e SYNOWIECKI *et al* [32].

Em solução de TCA 10%, a solubilidade diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) entre o IPS (21,43%), hidrolisado (82,90%) e plasteína (35,08%). Estes valores estão de acordo com o grau de hidrólise e rendimento da plasteína descritos no item 3.1, os quais determinam a solubilidade e a insolubilidade do nitrogênio em solução de TCA 10%, respectivamente.

A elevada solubilidade destas fontes protéica em água e em diferentes solvente, permite sua utilização em sistemas alimentares líquidos com ampla variação de pH, tais como bebidas isotônicas, sucos de frutas ou líquidos de elevado teor nitrogenado.

A capacidade emulsificante, determinada em água destilada e solução de NaCl 0,5M contendo as concentrações de 2,5 e 5,0% de proteína, está representada na *Tabela 2*. A capacidade emulsificante do IPS foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que a do hidrolisado e a da plasteína, sendo que esta última apresentou capacidade emulsificante maior ( $p < 0,05$ ) que a do hidrolisado. Esta capacidade variou conforme o meio de dissolução, sendo maior em água do que em solução de NaCl 0,5M, em todas as amostras analisadas.

**TABELA 2.** Capacidade emulsificante do IPS, hidrolisado e plasteína (mL de óleo/100mL de emulsão) analisada à temperatura ambiente, nas concentrações de 2,5 e 5,0% de proteína<sup>1,2</sup>.

Produto	IPS		Hidrolisado		Plasteína	
	2,5%	5,0%	2,5%	5,0%	2,5%	5,0%
Água destilada	51,0 ± 2,85 <sup>a</sup>	51,8 ± 2,05 <sup>a</sup>	23,8 ± 1,52 <sup>c</sup>	24,5 ± 1,97 <sup>c</sup>	30,9 ± 1,67 <sup>c</sup>	31,2 ± 2,13 <sup>e</sup>
Solução de NaCl 0,5M	48,0 ± 2,56 <sup>b</sup>	48,5 ± 2,03 <sup>b</sup>	20,2 ± 1,84 <sup>d</sup>	20,7 ± 1,84 <sup>d</sup>	29,3 ± 0,98 <sup>f</sup>	28,6 ± 1,05 <sup>f</sup>

<sup>1</sup> Valores médios de 2 repetições. Cada repetição foi analisada em triplicata (± desvio padrão).

<sup>2</sup> Valores com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As propriedades emulsificantes de proteínas submetidas à modificação por hidrólise enzimática têm sido amplamente citadas na literatura, o que não ocorre com a caracterização de produtos da reação de plasteína. ADLER-NISSEN [1] verificou uma redução significativa da capacidade emulsificante de um hidrolisado de IPS quando o grau de hidrólise aumentou de 5 para 9%. Isto poderia ser atribuído à exposição dos grupos hidrofóbicos presentes no interior da proteína, os quais aumentam a adsorção na superfície formando um filme superficial coesivo, contendo resíduos hidrofóbicos interagindo com óleo e os resíduos hidrofílicos com a

água. MAHMOUD [19] também avaliou capacidade de emulsificação da caseína durante uma hidrólise enzimática com pancreatina e demonstrou que esta atividade diminui conforme o grau de hidrólise aumenta (Grau de hidrólise final = 67%). O mesmo autor [20] verificou que a especificidade da protease desempenha um papel importante na propriedade emulsificante devido à sua influência direta no tamanho e peso molecular dos peptídeos resultantes. TURGEON *et al* [33] demonstraram que hidrolisados de soro lácteo produzido com quimotripsina apresentaram menor capacidade emulsificante que os produzidos por tripsina.

Os valores obtidos no presente trabalho para a capacidade emulsificante demonstraram uma diferença importante na funcionalidade tecnológica da plasteína em relação ao hidrolisado pancreático de IPS. A plasteína mostrou ser mais adequada para o preparo de formulações que tenham teores mais elevados, além da facilidade de obter formulações alimentares mais homogêneas.

A redução do peso molecular também pode aumentar a difusão na interface molecular favorecendo a formação de espuma. A capacidade espumante e sinérese do IPS, hidrolisado e plasteína estão representadas na *Tabela 3*.

**TABELA 3.** Capacidade espumante e sinérese do IPS, hidrolisado e plasteína, sendo utilizado 3% de amostra<sup>1,2</sup>.

Propriedade	IPS	Hidrolisado	Plasteína
Volume após agitação (mL)	23,0 ± 1,85 <sup>a</sup>	35,0 ± 2,36 <sup>b</sup>	44,0 ± 2,56 <sup>c</sup>
Volume da espuma após agitação (mL)	3,0 ± 0,69 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,89 <sup>b</sup>	17,0 ± 1,19 <sup>c</sup>
Volume da espuma após 30 minutos (mL)	0,8 ± 0,14 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,23 <sup>b</sup>	5,0 ± 0,75 <sup>c</sup>
Capacidade espumante (%)	13,3 ± 1,87 <sup>a</sup>	40,0 ± 2,23 <sup>b</sup>	46,6 ± 2,51 <sup>c</sup>
Sinérese (%)	10,0 ± 1,29 <sup>a</sup>	28,6 ± 2,44 <sup>b</sup>	36,0 ± 3,24 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> Valores médios de 2 repetições. Cada repetição foi analisada em triplicata (± desvio padrão).

<sup>2</sup> Valores com letras iguais na mesma coluna e para cada propriedade não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A modificação enzimática promoveu um aumento da capacidade espumante, sendo significativamente maior ( $p < 0,05$ ) na plasteína (46,6%), quando comparada ao hidrolisado (40,0%) e IPS (13,3%). A sinérese, também denominada estabilidade da espuma, foi proporcional à capacidade espumante, sendo maior na plasteína (36,0%). O poder espumante mede o aumento de volume que ocorre com a introdução de gás em uma solução ou dispersão de proteínas, enquanto que a estabilidade de espuma se refere à habilidade da espuma formada em manter seu volume inalterado pelo maior período de tempo possível. Em geral, quanto maior o tempo para formar o colapso maior a estabilidade da espuma [15, 16].

A aplicação da espuma na indústria de alimentos é ampla e têm sido empregada principalmente na produção de merengues, mousses, uma variedade de produtos aerados e cerveja. Experimentos com soluções de proteínas mostram que elas formam um filme viscoelástico na interface ar/água e desempenham um papel fundamental na estabilidade da espuma. O caráter anfótero das cadeias laterais das proteínas é responsável pela sua adsorção na interface [10].

A viscosidade é importante para a estabilidade física das emulsões e outras partículas suspensas em alimentos e contribui diretamente para a textura dos alimentos em geral. Os principais fatores que influem na viscosidade de soluções protéicas são a concentração, condições de dispersão e força iônica. Também podem influenciar a temperatura, o Ph e o processamento. As mudanças que ocorrem na viscosidade induzidas pelo processamento incluem: agregação protéica devido ao aquecimento, produção de concentrados protéicos e a hidrólise de proteínas. Os alimentos geralmente exibem uma viscosidade que varia com o tempo e com a força de cisalhamento aplicada e é conhecido como tixotropia. Nestes casos, a viscosidade pode ser reduzida até um determinado limite, sendo a partir daí, constante [10].

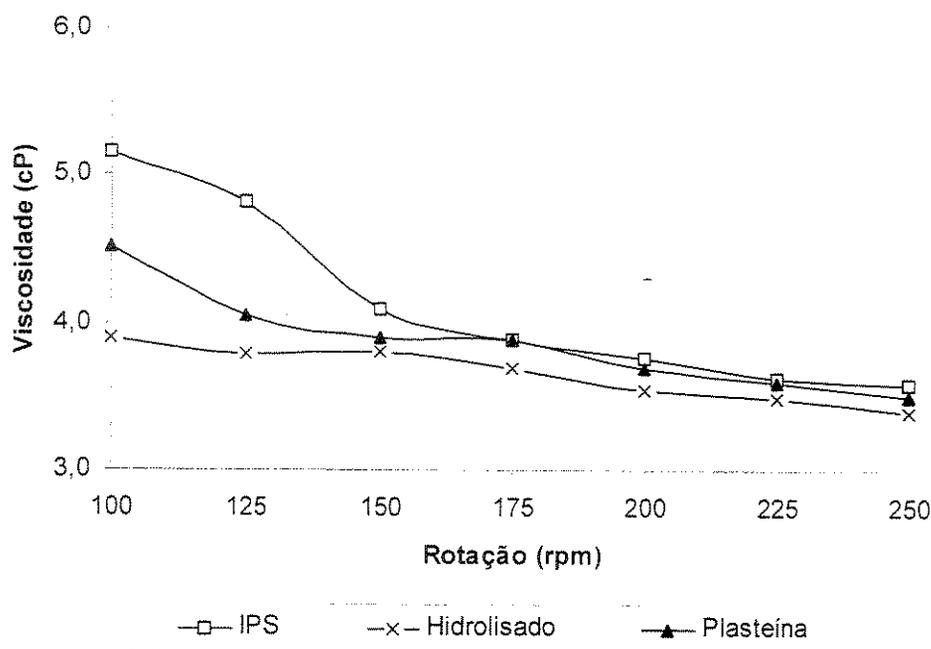
A viscosidade e as diferentes propriedades relativas estão demonstradas na *Tabela 4* e na *Figura 1*. Os produtos foram avaliados sob diferentes rotações que variaram 100 a 250 rpm.

**TABELA 4.** Viscosidade, Torque e Força de cisalhamento do IPS, hidrolisado e plasteína, determinada em viscosímetro Brookfield DV3 com spindler N° 18 à temperatura de 25°C<sup>1</sup>.

Propriedade	Rotação (rpm)	IPS	Hidrolisado	Plasteína
<b>Torque (%)</b>	100	10,3 ± 1,93 <sup>a</sup>	7,2 ± 1,84 <sup>b</sup>	8,8 ± 1,23 <sup>b</sup>
	125	13,0 ± 1,48 <sup>c</sup>	9,7 ± 1,56 <sup>a</sup>	10,5 ± 1,71 <sup>a</sup>
	150	15,8 ± 1,65 <sup>d</sup>	13,5 ± 1,73 <sup>c</sup>	14,3 ± 1,95 <sup>c</sup>
	175	18,5 ± 2,45 <sup>d</sup>	19,5 ± 2,31 <sup>d</sup>	19,3 ± 2,83 <sup>d</sup>
	200	23,6 ± 2,19 <sup>e</sup>	22,7 ± 2,59 <sup>e</sup>	21,9 ± 2,09 <sup>d</sup>
	225	26,2 ± 2,55 <sup>f</sup>	25,2 ± 2,07 <sup>f</sup>	24,4 ± 1,98 <sup>f</sup>
	250	29,5 ± 2,38 <sup>g</sup>	27,9 ± 2,15 <sup>g</sup>	29,8 ± 2,38 <sup>g</sup>
<b>Força de cisalhamento (D/cm<sup>2</sup>)</b>	100	5,66 ± 1,49 <sup>a</sup>	5,15 ± 1,05 <sup>a</sup>	5,34 ± 1,71 <sup>a</sup>
	125	6,61 ± 1,34 <sup>a</sup>	6,57 ± 1,68 <sup>a</sup>	6,26 ± 1,69 <sup>a</sup>
	150	7,64 ± 1,51 <sup>b</sup>	7,32 ± 1,39 <sup>b</sup>	7,72 ± 1,54 <sup>b</sup>
	175	8,99 ± 1,41 <sup>b</sup>	8,27 ± 1,04 <sup>b</sup>	8,67 ± 1,63 <sup>b</sup>
	200	9,98 ± 1,26 <sup>c</sup>	9,34 ± 1,79 <sup>c</sup>	9,66 ± 1,99 <sup>c</sup>
	225	11,0 ± 1,70 <sup>c</sup>	10,4 ± 1,89 <sup>c</sup>	10,8 ± 2,06 <sup>c</sup>
	250	12,4 ± 2,34 <sup>d</sup>	11,2 ± 1,97 <sup>c</sup>	11,8 ± 2,03 <sup>d</sup>
<b>Viscosidade<sup>2</sup> (cP)</b>	100	5,2 ± 0,56 <sup>a</sup>	3,9 ± 0,89 <sup>c</sup>	4,5 ± 0,75 <sup>b</sup>
	125	4,8 ± 0,85 <sup>b</sup>	3,8 ± 0,54 <sup>c</sup>	4,1 ± 0,69 <sup>c</sup>
	150	4,1 ± 0,74 <sup>c</sup>	3,8 ± 0,43 <sup>c</sup>	3,9 ± 0,26 <sup>c</sup>
	175	3,9 ± 0,68 <sup>c</sup>	3,7 ± 0,72 <sup>c</sup>	3,9 ± 0,47 <sup>c</sup>
	200	3,8 ± 0,51 <sup>c</sup>	3,5 ± 0,63 <sup>c</sup>	3,7 ± 0,33 <sup>c</sup>
	225	3,6 ± 0,66 <sup>c</sup>	3,5 ± 0,41 <sup>c</sup>	3,6 ± 0,59 <sup>c</sup>
	250	3,6 ± 0,59 <sup>c</sup>	3,4 ± 0,67 <sup>c</sup>	3,5 ± 0,87 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> Valores médios de 2 repetições. Cada repetição foi analisada em triplicata (± desvio padrão).

<sup>2</sup> Valores com letras iguais na mesma coluna e para cada propriedade não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).



**FIGURA 1.** Viscosidade do IPS, hidrolisado e plasteína submetidas às diferentes rotações, sob temperatura de 25°C e 10% de concentração de proteína. Valores obtidos da *Tabela 4*.

A viscosidade diminuiu com o processo de modificação enzimática e com o aumento das rotações em as amostras foram submetidas. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a viscosidade do IPS, hidrolisado e plasteína, somente quando as amostras foram submetidas a rotação de 100 rpm (3,9; 4,5 e 5,2 cP, respectivamente). Neste caso, verificou-se que a plasteína apresentou viscosidade superior ao hidrolisado pancreático. Contudo, observa-se que a partir de 150 rpm, a viscosidade diminuiu e não houve diferença significativa entre o IPS, hidrolisado e plasteína. Isto provavelmente ocorreu devido à rotação de 100 rpm representar o limite para o torque e força de cisalhamento a qual estas fontes protéicas foram submetidas.

A redução da viscosidade ocorreu de maneira inversa ao torque e à força de cisalhamento, ou seja, quanto maior o torque e a força de cisalhamento menor a viscosidade. Este comportamento demonstrou que tanto o hidrolisado quanto a plasteína de IPS são tixotrópicos. Resultados semelhantes foram citados na literatura por WILLIAMS *et al* [38], ao

avaliaram a aplicação da reação de síntese de plasteína na micoproteína (Quorn™) produzida pela fermentação da cepa de *Fusarium graminearum*.

A superioridade da plasteína quanto à viscosidade representa uma importante funcionalidade tecnológica desta fonte protéica, pois a viscosidade poderia ser controlada sob as diferentes condições de processamento e, em especial, sob diferentes condições de rotação. A maioria das dietas comerciais contendo proteínas intactas ou modificadas por hidrólise enzimática apresenta densidade calórica entre 1,0 e 1,6 kcal/mL e, apesar das dietas isotônicas serem mais bem toleradas pelo aparelho digestivo, cuidados especiais são necessários durante sua administração [28]. A osmolalidade do hidrolisado e plasteína de IPS foram determinadas diluindo o produto para obter a densidade calórica de 1,0 kcal/mL. A osmolalidade do hidrolisado foi de  $328 \pm 28$  mOsm/KgH<sub>2</sub>O e da plasteína de  $342 \pm 31$  mOsm/KgH<sub>2</sub>O, não havendo diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre eles. Este resultado indica que estes produtos são isotônicos quando comparados aos valores citados na legislação brasileira [3].

Para verificar o efeito da modificação enzimática através da reação de hidrólise e síntese de plasteína no sabor, foi avaliado o grau de sabor amargo apresentado pelas amostras. Foi utilizada uma escala de 5 pontos, considerando o valor 1 “não amargo” e 5 “fortemente amargo”. A média dos valores obtidos foi de  $1,8 \pm 0,2$  para o IPS;  $3,7 \pm 0,3$  para o hidrolisado e  $2,9 \pm 0,3$  para a plasteína, sendo que estes valores diferiram entre si ao nível de 5% de significância. A produção de plasteína mostrou ser um processo eficiente na redução do sabor amargo comumente presente nos hidrolisados enzimáticos, que utilizam a soja como substrato.

Este resultado está de acordo ao obtido por SALADO [28], quando avaliou o sabor de uma dieta contendo hidrolisado pancreático de IPS, apresentado em três versões: natural, morango e baunilha. Os resultados indicaram uma baixa aceitabilidade do produto devido ao sabor amargo identificado nas três versões. SYNOWIECKI *et al* [32] também estudaram a influência da reação de síntese de plasteína no sabor amargo de hidrolisados obtidos de eritrócitos bovino utilizando a Alcalase como sistema enzimático nas duas etapas. O hidrolisado apresentou forte sabor amargo (4,3 numa escala de 5 pontos) sendo reduzido significativamente ( $p < 0,05$ ) na plasteína, a qual apresentou valor de 2,0. Neste trabalho, os

autores também verificaram que a reação de síntese de plasteína melhorou a cor do produto e não houve diferença na solubilidade do hidrolisado e plasteína.

#### 4 – CONCLUSÃO

A modificação enzimática do IPS através da hidrólise e reação de síntese de plasteína promoveu mudanças nas propriedades funcionais analisadas no presente trabalho. Foi avaliada a solubilidade em diferentes meios de dissolução, capacidade emulsificante e espumante, viscosidade, osmolalidade e sabor.

A solubilidade em água destilada, solução tampão fosfato 10mM e solução de ácido acético 50% (v/v) foi igual e em torno de 86% para o IPS, 93% para o hidrolisado e 92% para a plasteína. Em solução de SDS 0,3M, não houve diferença significativa, enquanto que em solução de TCA 10%, a solubilidade diferiu entre as amostras, sendo maior no hidrolisado (82,90%), seguido pela plasteína (35,08%) e IPS (21,43%).

A capacidade emulsificante, determinada em água destilada e solução de NaCl 0,5M mostrou ser maior no IPS, seguido pela plasteína e hidrolisado. Esta capacidade foi maior em água do que em solução de NaCl 0,5M, em todas as amostras analisadas.

A modificação enzimática também promoveu um aumento da capacidade espumante, sendo significativamente maior na plasteína (46,6%), quando comparada ao hidrolisado (40,0%) e IPS (13,3%). A sinérese foi proporcional à capacidade espumante, sendo maior na plasteína (36,0%).

A viscosidade diminuiu com o processo de modificação enzimática e com o aumento das rotações em que foram submetidos. Houve diferença significativa entre a viscosidade do IPS, hidrolisado e plasteína, somente quando as amostras foram submetidas à rotação de 100 rpm (3,9; 4,5 e 5,2 cP, respectivamente), sendo maior na plasteína em comparação com o hidrolisado pancreático. Contudo, observa-se que a partir de 150 rpm, a viscosidade diminuiu

e não houve diferença significativa entre o IPS, hidrolisado e plasteína. Este comportamento demonstrou que tanto o hidrolisado quanto a plasteína de IPS são tixotrópicos.

A osmolalidade do hidrolisado foi de 328 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O e da plasteína de 342 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O, não havendo diferença significativa entre eles e são considerados produtos alimentares isotônicos pelos valores citados na legislação brasileira. O grau de sabor amargo do hidrolisado e plasteína de IPS apresentou os valores médios de 1,8 para o IPS; 3,7 para o hidrolisado e 2,9 para a plasteína, numa escala de 5 pontos, sendo que a menor nota se refere ao produto menos amargo.

Considerando a síntese de plasteína um processo de modificação enzimática que promoveu um aumento da capacidade espumante e emulsificante, uma melhora no sabor amargo e valores similares de solubilidade e osmolalidade quando comparada ao hidrolisado pancreático de IPS, esta reação mostrou ser uma alternativa viável na utilização de produtos alimentares para diversos fins, e em especial, bebidas com ampla variação de pH, concentração e condições de rotação controlada (100 rpm).

## 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADLER-NISSEN, J. **Enzymatic hydrolysis of food proteins**. Londres: Elsevier, 1986. 426p.
- [2] ANDREWS, A.T., ALICHANIDIS, E. The plastein reaction revisited: Evidence for a purely aggregation reaction mechanism. **Food Chem.**, v. 35, n. 4, p. 243-61, 1990.
- [3] ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução N° 449, publicada DOU em 13/09/99, <http://www.anvisa.gov.br>, 20/07/02.
- [4] A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12 ed. Washington, 1990.

- [5] ARAI, S. & FUJIMAKI, M. The plastein reaction: theoretical basis. **Ann. Nutr. Alim.**, v. 32, p. 701-7, 1978.
- [6] BELIKOV, V.M. & GOLOLOBOV, M.Y. Plasteins, their preparation, properties, and use in nutrition. **Die Nahr.**, v. 30, p. 281-7, 1986.
- [7] BETSCHART, K., SAWADA, K. Whipping and emulsifying of soybean products. **Agric. Biol. Chem.**, v. 36, p. 719-27, 1972.
- [8] CHOBERT, J.M. & DEESLIE, W.D. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. **J. Agric. Food Chem.**, v.36, n.5, p.883-92, 1988.
- [9] COCKRAN, W.G. & COX, G.M. Experimental design. 2ed. New York: John Wiley, 1957, 611p.
- [10] HALL, G.M. **Methods of testing protein functionality**. Chapman & Hall Ed., London, 1996. 265p.
- [11] HARTNETT, E.K., SATTERLEE, L.D. The formation of heat and enzyme induced (plastein) gels from pepsin - hydrolyzed soy protein isolate. **J. Food Bioch.**, v. 14, n. 1, p. 1-3, 1990.
- [12] HOFSTEN, B. & LALASIDIS, G. Protease-catalysed formation of plastein products and some of their properties. **J. Agric. Food Chem.**, v. 24, p. 460-5, 1976.
- [13] HSU, D.L., LEUNG, H.K., MORAD, M.M. Effects of germination on eletroforetic, functional and bread-baking properties of yellow pea, lentil and faba protein isolates. **Cereal Chem.**, v.59, n.5, p.344-50, 1982.
- [14] JEN, S.C.; DEE, C.W.; HWA, C.Y. Continuous enzymatic production of soy protein hydrolysate with specific functional properties. **J. Chin. Agric. Chem. Soc.**, v. 37, p. 360-70, 1999.

- [15] KINSELA, J.E. Functional properties of proteins in foods: a survey. **CRC Critical Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 1, p. 219-81, 1976.
- [16] KINSELA, J.E., GERMAN, B., DAMODARAN, S. Physicochemical and function properties of oilseed proteins with emphasis on soy proteins. In: **New protein foods**. New York: Academic Press, 1985, v. 5.
- [17] LEE, K.T.; PARK, S.H.; LEE, S.H.; RYU, H.S. Improvement of functional properties of extracts from hydrothermal cooked fish meat by plastein reaction. **J. Kor. Soc. Food Sci. Nut.**, v. 27, p. 93-101, 1998.
- [18] MacBURNEY, M.M., YOUNG, L. S. Formulas. In: **Enteral and tube feeding**. Ed. ROMBEAU & CALDWELL, 1984, p. 171-98.
- [19] MAHMOUD, M.I., MALONE, W.T., CORDLE, C.T. Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. **J. Food Sci.**, v. 57, p. 1223-9, 1992.
- [20] MAHMOUD, M.I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Tech.**, v. 48, n. 4, p. 89-95, 1994.
- [21] MARTINS, M.T.S. 1994, **Obtenção e caracterização química e imunológica parcial de plasteína obtida a partir de isolado protéico de soja e caseína**. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 96p.
- [22] MELLO, P. Oleaginosa reina absoluta. **A Granja**, Porto Alegre, n. 639, p. 28-32, 2002.
- [23] MUTILANGI, W.A.M., PANYAM, D., KILARA, A. Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. **J. Food Sci.**, v.61, n.2, p.270-4, 1996.

- [24] NETTO, F.M. 1992, **Produção e caracterização de hidrolisado pancreático de Isolado Protéico de soja para nutrição clínica**. Dissertação (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 161p.
- [25] NETTO, F.M. & GALEAZZI, M.A. Production and characterization of enzymatic hydrolysate from soy protein isolate. **Lebensmittel-Wissenschaft & Tech.**, v.31, n.7-8, p.624-31, 1998.
- [26] PHILLIPS, R.D., BEUCHAT, L.R. Enzyme modification of proteins. In: **Protein functionality in foods**, ed. CHERRY, Washington D.C. 1981, p. 1-19.
- [27] PUSKI, G. Modification of functional properties of soy proteins by proteolytic enzyme treatment. **Cereal Chem.**, v. 52: p. 655-64, 1975.
- [28] SALADO, G.A. 1997. **Resposta nutricional de pacientes hospitalizados tratados com dieta formulada de hidrolisado protéico de soja**. Dissertação (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1997. 159p.
- [29] SCHMANDKE, H. Die plasteinsynthese als eine möglichkeit zur modifizierung funktioneller eigenschaften von protein. **Die Nahr.**, 20: 567-73, 1976.
- [30] SMITH, A.K.; CIRCLE, S.J. **Soybeans: chemistry and technology**. v. 1, AVI publishing, Connecticut, 1972. 470p.
- [31] SUKAN, G. & ANDREWS, A.T. Application to the plastein reaction to casein and skim-milk powder. **J. Dairy Res.**, v. 49, p. 265-78, 1982.
- [32] SYNOWIECKI, J.; JAGIELKA, R.; SHAHIDI, F. Preparation of hydrolysates from bovine red blood cells and their debittering following plastein reaction. **Food Chem.**, v. 57, p. 435-39, 1996.

- 
- [33] TURGEON, S.L., GAUTHIER, S.F., PAQUIN, P. Interfacial and emulsifying properties of whey peptide fractions obtained with a two step ultrafiltration process. **J. Agric. Food Chem.**, v. 39, p. 673-6, 1991.
- [34] TSAI, S.; YAMASHITA, M.; ARAI, S.; FUJIMAKI, M. Polyacrilamide gel electrophoresis of plasteins. **Agric. Biol. Chem.**, **38**: 641-4, 1974.
- [35] YAMASHITA, M., ARAI, S., FUJIMAKI, M. Plastein reaction for food protein improvement. **J. Agric. Food Chem.**, v. 24, p. 1100-4, 1976.
- [36] YASUMATSU, K., SAWADA, K., MORITAKA, S., MISAKI, M., ISHI, K. Whipping and emulsifying of soybean products. **Agric. Biol. Chem.**, v. 36, p. 719-27, 1972.
- [37] YEBOAH, F.K., ALLI, I., SIMPSON, B.K., KONISHI, Y., GIBBS, B.F. Tryptic fragments of phaseolin from protein isolates of *Phaseolus beans*. **Food Chem.**, v.67, n.2, p.105-12, 1999.
- [38] WILLIAMS, R.J.H.; BROWNSSELL, V.L.; ANDREWS, A.T. Application of the plastein reaction to mycoprotein: I. Plastein synthesis. **Food Chem.**, v. 72, p. 329-35, 2001.

## CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho avaliou as propriedades químicas e funcionais da plasteína produzida a partir de hidrolisado de isolado protéico de soja, utilizando a pancreatina como sistema enzimático. Foram avaliadas as distribuições de peso moleculares, o escore químico de aminoácidos essenciais, a solubilidade em diferentes meios de dissolução, capacidade emulsificante e espumante, viscosidade, osmolalidade e sabor.

O monitoramento da reação de hidrólise e de síntese de plasteína foi realizado através do grau de hidrólise, verificado pela solubilidade do nitrogênio em TCA 10%, e sendo de 83,7%, e pela produtividade da plasteína, avaliada pela insolubilidade do nitrogênio em TCA a 10%, e sendo de 65,8%.

O hidrolisado pancreático de IPS apresentou perfil cromatográfico com 5 frações de PM na faixa de 5,4 a 66,2 kDa e a plasteína com 2 frações de PM na faixa de 9,6 e 58,7 kDa. O hidrolisado apresentou uma distribuição de PM mais homogênea. A SDS-PAGE não permitiu a visualização das bandas tanto no hidrolisado quanto na plasteína.

O escore químico de aminoácidos essenciais confirmou a presença dos aminoácidos sulfurados como limitantes sendo obtido os valores de 93,2 e 96,4% para o hidrolisado e plasteína de IPS, respectivamente. A relação hidrofóbica/hidrofílica do perfil de aminoácidos foi de 23/48 para o hidrolisado e de 27/39 para a plasteína, caracterizando o caráter mais hidrofóbico da plasteína em relação ao hidrolisado.

A possível aplicação tecnológica destes produtos foi avaliada através das propriedades funcionais. A solubilidade em água destilada, solução tampão fosfato 10mM e solução de ácido acético 50% (v/v) foi igual e em torno de 86% para o IPS, 93% para o hidrolisado e 92% para a plasteína. Em solução de SDS 0,3M, não houve diferença significativa, enquanto que em solução de TCA 10%, a solubilidade diferiu entre as amostras, sendo maior no hidrolisado (82,90%), seguido pela plasteína (35,08%) e IPS (21,43%).

A capacidade emulsificante, determinada em água destilada e solução de NaCl 0,5M mostrou ser maior no IPS, seguido pela plasteína e hidrolisado. Esta capacidade foi maior em água do que em solução de NaCl 0,5M, em todas as amostras analisadas.

A modificação enzimática também promoveu um aumento da capacidade espumante, sendo significativamente maior na plasteína (46,6%), quando comparada ao hidrolisado (40,0%) e IPS (13,3%). A sinérese foi proporcional à capacidade espumante, sendo maior na plasteína (36,0%).

A viscosidade diminuiu com o processo de modificação enzimática e com o aumento das rotações em que foram submetidos. Houve diferença significativa entre a viscosidade do IPS, hidrolisado e plasteína, somente quando as amostras foram submetidas à rotação de 100 rpm (3,9; 4,5 e 5,2 cP, respectivamente), sendo maior na plasteína em comparação com o hidrolisado pancreático. Contudo, observa-se que a partir de 150 rpm, a viscosidade diminuiu e não houve diferença significativa entre o IPS, hidrolisado e plasteína. Este comportamento demonstrou que tanto o hidrolisado quanto a plasteína de IPS são tixotrópicos.

A osmolalidade do hidrolisado foi de 328 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O e da plasteína de 342 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O, não havendo diferença significativa entre eles e são considerados produtos alimentares isotônicos pelos valores citados na legislação brasileira. O grau de sabor amargo do hidrolisado e plasteína de IPS apresentou os valores médios de 1,8 para o IPS; 3,7 para o hidrolisado e 2,9 para a plasteína, numa escala de 5 pontos, sendo que a menor nota se refere ao produto menos amargo.

Considerando a síntese de plasteína um processo de modificação enzimática que promoveu um aumento da capacidade espumante e emulsificante, uma melhora no sabor amargo e valores similares de solubilidade e osmolalidade quando comparada ao hidrolisado pancreático de IPS, esta reação mostrou ser uma alternativa viável na utilização de produtos alimentares para diversos fins, e em especial, bebidas com ampla variação de pH, concentração e condições de processamento com rotação controlada (100 rpm).

**ANEXO**

**REFERENTE AO CAPÍTULO 3**

---

**FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL**

Nome:..... Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Você está recebendo três amostras de solução protéica. Favor prová-las e atribuir o valor de sabor conforme a escala abaixo:

1. não amargo
2. pouco amargo
3. amargo
4. muito amargo
5. fortemente amargo

Amostra \_\_\_\_\_ Valor \_\_\_\_\_

Amostra \_\_\_\_\_ Valor \_\_\_\_\_

Amostra \_\_\_\_\_ Valor \_\_\_\_\_

Comentários: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_