

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E NUTRICIONAL DE PLASTEÍNA PRODUZIDA A PARTIR DE HIDROLISADO PANCREÁTICO DE ISOLADO PROTÉICO DE SOJA¹

Myrian Thereza Serra MARTINS²

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização química e nutricional da plasteína produzida a partir de isolado protéico de soja (IPS). O hidrolisado de IPS foi produzido em sistema descontínuo, 5% de substrato, relação enzima/substrato 1/20, 6 h, 37°C, sob agitação. A plasteína foi produzida com 40% de substrato em solução aquosa, pH 7, 24 h a 37°C, sob repouso. Na caracterização química, foi verificada a distribuição dos pesos moleculares por meio de eletroforese (SDS-PAGE) e cromatografia de exclusão molecular (CEM). A SDS-PAGE não permitiu a visualização das bandas tanto no hidrolisado quanto na plasteína. Na CEM 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 obtidos 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.

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

SUMMARY

CHEMICAL AND NUTRITIONAL CHARACTERIZATION OF PLASTEIN PRODUCED FROM PANCREATIC HYDROLYSATE OF SOY PROTEIN ISOLATE (SPI). 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, with a 5% substrate concentration, an enzyme/substrate ratio of 1/20, 37°C, 6 hours under constant stirring. The plastein was produced from this hydrolysate with a 40% substrate (w/v), pH 7, 37°C, for 24 hours without stirring. The protein profile was analyzed by gel electrophoresis (SDS-PAGE) and by molecular exclusion chromatography (MEC). The SDS-PAGE did not permit the bands visualization. The MEC pointed that 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.

Keywords: 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 [38]. A soja, devido a suas qualidades nutricionais e funcionais, disponibilidade de mercado, baixo custo e desenvolvimento de tecnologia apropriada, apresenta um consumo aumentado entre os povos ocidentais. A soja brasileira (subgênero *Glycine*), considerada como "soja tropical" apresenta em média 21% de óleo e 42% de proteína no farelo. 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 [20].

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]. 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. 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. A escolha do método depende de diversos fatores: reprodutibilidade de resultados, rapidez de obtenção de resultados e custos [1].

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.* [9], HENLEY & KUSTER [15], SARWAR & MACDONOUGH [26], TORUN *et al.* [33] e YOUNG & PELLET [39] 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

¹Recebido para publicação em 14/06/2004. Aceito para publicação em 30/08/2005 (001365).

²Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Nutrição. Av. Fernando Correa da Costa s/n, Coxipó, Cuiabá-MT, Brasil. Cep. 78068-742. myrianmartins@uol.com.br.

dirigida a fins nutricionais [12]. Os critérios de seleção mais importantes a serem considerados em hidrolisados protéicos incluem valor nutricional, custo, sabor, antigenicidade, solubilidade e funcionalidade [18]. O sabor de hidrolisados protéicos enzimáticos é normalmente caracterizado por um amargor associado ao aparecimento de peptídeos que apresentam aminoácidos hidrofóbicos no terminal carboxílico [20]. 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, 22].

A reação de síntese de plasteína pode ser considerada um processo enzimático que ocorre de modo reverso à hidrólise usual catalisada por proteinases [34]. Operacionalmente, a formação de plasteína tem sido definida como a formação de material insolúvel em solução de TCA 10%, etanol 70% ou acetona [31]. 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, 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 [24, 34].

A partir da década de 80, pesquisadores propuseram outros modelos de mecanismos para a reação de plasteína. LOZANO & COMBES [19] sugeriram que o processo de transpeptidação ocorre como mecanismo primário. ANDREWS & ALICHANIDIS [4] e SUKAN & ANDREWS [31] 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. 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 pancrea-

tina 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 (semimicro), conforme procedimento da AOAC [6]. Os teores de Umidade e Cinzas foram determinados conforme procedimento da AOAC [6] e lipídeos totais, segundo BLIGH & DYER [7]. 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 [20], modificado por SALADO [25] (com ajuste de pH), em sistema descontínuo. O reator enzimático (marca Tecnal) com capacidade de 10 L 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 6 h, agitação de 50 rpm e temperatura de 37°C. Foram realizadas 4 repetições de 10 L 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 1 mg/mL de azida sódica (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 6 h, segundo método proposto por YAMASHITA *et al.* [37], em que 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 [21]. O hidrolisado foi resfriado até a 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 [20], sendo utiliza-

do como matéria-prima o hidrolisado pancreático de IPS (40%) em solução aquosa de pH 7,0; com relação enzima/substrato de 1/20 e 1 mg/mL de NaNO₃. A incubação ocorreu em reator marca Tecnal, com capacidade para 10 L, sob repouso, a 37°C, durante 24 h. A reação de síntese de plasteína foi monitorada pela determinação do rendimento (α) em solução de TCA a 10%, sendo definida como a relação de nitrogênio insolúvel em solução de TCA a 10% pelo nitrogênio total [60]. Após a incubação, procedeu-se de forma semelhante ao hidrolisado. Foram realizadas duas repetições de 2 L 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 poliácridamida 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 [17] e adaptado ao método proposto por PETRUCCELLI & AÑÓN [24], utilizando gradiente de gel de 4 a 20%. A calibração do gel foi realizada com padrões de proteína da Pharmacia cujo peso molecular variou de 14,4 a 94 kDa (α -lactoalbumina: 14,4 kDa; 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 0,05 M, pH 5,8. A cromatografia foi desenvolvida em coluna XK-16/100 (Pharmacia), a uma velocidade de 1 mL/min., à temperatura de 22°C. Foram coletadas frações de 3 mL, sendo as proteínas detectadas pela leitura de absorbância, no comprimento de onda de 280 nm, em cubetas de 1 cm de caminho óptico. O volume de exclusão (V₀) foi determinado usando Blue Dextran 2000 (1 mg/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: 158 kDa).

2.2.5 - Escore químico de aminoácidos essenciais (EQ)

Calculado a partir do resultado do aminograma, utilizando o padrão de referência da FAO/OMS [11], segundo YOUNG & PELLET [39], sendo expresso pela seguinte Equação (1):

$$EQ (\%) = \frac{\text{mg de aminoácido/g de proteína teste}}{\text{mg de aminoácido/g de proteína padrão}} \times 100 \quad (1)$$

A análise de aminoácidos essenciais foi feita através do método de SPACKMAN *et al.* [29], 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 [10]. Para as curvas de calibração foi utilizado o coeficiente de correlação obtido da 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 [28]. 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 são utilizados 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 [20], HENN & NETTO [16], NETTO & GALEAZZI [21] e SALADO [25], todos considerando o fator de conversão de 6,25. Valores superiores a 96,9% (N x 6,25) em base seca foram obtidos por SOUZA [27] 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 ¹
Proteína (N x 6,25) ²	90,2±0,04
Proteína (N x 5,71) ²	82,4±0,04
Umidade	5,4±0,09
Cinzas ²	3,9±0,05
Lipídeos ²	0,7±0,11

¹Valores médios de 3 determinações ± desvio padrão

²Valores expressos em base seca

O conteúdo de umidade e cinzas está de acordo com os encontrados por MARTINS [20], SALADO [25], HENN & NETTO [16] e SOUZA [27]. Quanto ao conteúdo de lipídeos, o valor obtido está semelhante ao descrito por MARTINS [20] e SALADO [25] e abaixo dos valores encontrados por HENN & NETTO [16] e SOUZA [27]. HENN & NETTO [16] 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 & GALEAZZI [21], HAGAN & VILLOTA [14] 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 [25] (com controle de pH) e inferior ao obtido por MARTINS [20] (sem controle de pH). Estes valores são superiores aos apresentados por NETTO & GALEAZZI [21], 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. 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 [20].

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%. 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).

BROWSELL *et al.* [8] e WILLIAMS *et al.* [36] 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.* [32] 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.* [32] 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 transpeptidação, o qual poderia ser igualmente explicado pela formação de material agregado, acompanhado de pouca hidrólise contínua. LOZANO & COMBES [19] verificaram que a atividade enzimática é alterada com a concentração do substrato e os valores de transpeptidação/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.* [30]. 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, transpeptidação e agregação física), conforme as condições da reação. Em sistemas de pequenos peptídeos, as reações de condensação e transpeptidação 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 transpeptidação. 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 presentes na mistura.

3.3 - Caracterização do peso molecular

A eletroforese em gel de poli(acrilamida) 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 [24]. Os perfis eletroforéticos do hidrolisado e da plasteína são demonstrados na Tabela 2.

O método de SDS-PAGE com gradiente de 4 a 20% de acrilamida permitiu o monitoramento das mudanças ocorridas com o IPS submetido às reações de hidrólise e plasteína. O IPS apresentou 7 bandas com PM que variou de 20,2 a 81,4 kDa. No hidrolisado pancreático e plasteína não houve a detecção de bandas, sendo verificado uma coloração mais intensa na região inferior ao PM de 28 kDa. Apesar de esta metodologia não ser específica para peptídeos de baixo peso molecular, verifica-se que a hidrólise foi extensa.

MARTINS [20] avaliou a SDS-PAGE do IPS, hidrolisado pancreático e plasteína de IPS em gel a 8% de acrilamida e o IPS apresentou PM variando de 14,4 a 71 kDa. Não foi pos-

sível detectar bandas com PM inferior a 60 kDa 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, α -quimotripsina e carboxipeptidases A e B, tem ambas as atividades de endo- e exopeptidases [35]. Na SDS-PAGE apresentou 7 bandas na concentração de 5 mg/mL e 6 na concentração de 2,5 mg/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 [34]. O perfil cromatográfico do hidrolisado e plasteína são apresentados na *Figura 1*.

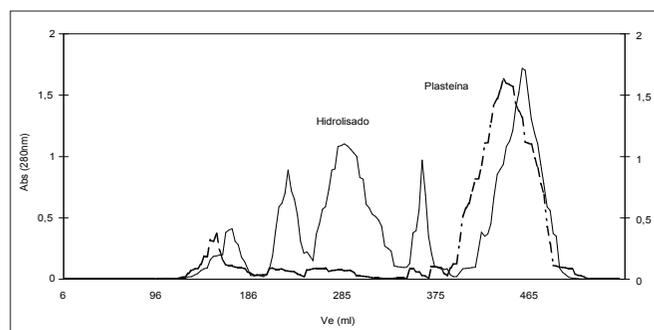


FIGURA 1 – Perfil da cromatografia de exclusão molecular em gel Sephacryl S-200 do hidrolisado pancreático e plasteína de IPS, eluído em tampão fosfato 0,05 M, pH 5,8 e detectado em absorbância de 280 nm

Os resultados sugerem que, na plasteína, houve predominância de peptídeos de baixo e alto PM, sendo que 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, sendo que 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 [20], que utilizou o gel Bio-Rad P60 e detectou duas frações na faixa de 45 kDa e 420 Da, para o hidrolisado e 6 frações pouco definidas 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 poli-acrilamida (4-20%), na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e cromatografia de exclusão molecular em gel Sephacryl S-200, eluído em tampão fosfato 0,05 M, 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

YAMASHITA *et al.* [37] observaram 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, 37]. 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.

SUKAN & ANDREWS [31] caracterizaram uma plasteína obtida a partir de hidrolisado péptico de caseína e o perfil dos peptídeos originalmente presentes no hidrolisado também estava presente na plasteína e o conteúdo de aminogrupos não foi alterado 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.

BROWNSSELL *et al.* [8] e WILLIAMS *et al.* [36] 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 de 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, o 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.* [30] 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 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. Estes trabalhos 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 e das 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 [39].

A Tabela 3 mostra o escore químico dos aminoácidos essenciais do hidrolisado e plasteína de IPS comparado ao padrão FAO/OMS [11]. 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 necessária uma suplementação dos aminoácidos sulfurados quando estes produtos são utilizados como fonte exclusiva de proteína.

O EQ do hidrolisado de IPS foi superior ao relatado por MARTINS [20], 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 [25] 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 mos-

traram 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.

BROWNSSELL *et al.* [8] 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 hidrofílicos, a relação de aminoácidos hidrofóbico/hidrofílico foi de 24,3/34,1 no hidrolisado e de 41,3/25,1 na plasteína.

Ao avaliarmos a relação hidrofóbica/hidrofílica do perfil de aminoácidos do hidrolisado pancreático e plasteína de PIS conforme a descrição de BROWNSSELL *et al.* [8], 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 [31], 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.* [23], ao avaliarem a qualidade nutricional do isolado protéico da folha de mandioca (IPFM) combinado 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.* [32] 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, em que houve a incorporação de elevadas quantidades de ácido glutâmico (26%) e menor teor de aminoácidos livres (1,85 mg g⁻¹ na plasteína e 18,57 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

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

Aminoácidos essenciais (mg/g proteína)	Fontes protéicas			EQ (%)	
	Padrão [11]	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

plasteína. Estes resultados estão relacionados aos baixos teores de aminoácidos sulfurados e isoleucina detectados no hidrolisado e na plasteína.

SOUZA *et al.* [28] 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 - CONCLUSÕES

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 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 obtidos 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 nos quais 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.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADLER-NISSEN, J. **Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins**. London, Elsevier, 1986. 426 p.
- [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**. 12th ed. Washington, 1990.
- [7] BLIGH, E.G. & DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, **37**: 911-7, 1959.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] COCKRAN, W.G. & COX, G.M. Experimental design. 2nd ed. New York: John Wiley, 1957, 611 p.
- [11] FAO/WHO-Report of the joint FAO/WHO-**Protein Quality Evaluation**. Food and Nutrition Paper. 51-Rome, 1991.
- [12] FREITAS, O.; PADOVANI, G.J.; VILELA, L.; SANTOS, J.E. dos; OLIVEIRA, J.E.D. de; GREENE, L.J. Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition. **J. Agric. Food Chem.**, v. 41, n. 9, p. 1432-8, 1994.
- [13] FRØKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. **Food Tech.**, v. 48, n. 4, p. 86-8, 1994.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p.680-85, 1970.
- [18] LAHL, W.J.; BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Tech.**, v. 48, n. 4, p. 68-71, 1994.
- [19] LOZANO, P.; COMBES, D. Effect of alkali halides on α -chymotrypsin activity in the plastein reaction. **J. Sci. Food Agric.**, v. 62, v. 3, p. 245-52, 1993.
- [20] 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, 96 p.
- [21] NETTO, F.M.; GALEAZZI, M.A.M. Production and characterization of enzymatic hydrolysate from soy protein isolate. **Lebens-Wissensc. Tech.**, London, v. 31, p. 624-31, 1998.
- [22] PEDERSEN, B. Removing bitterness from protein hydrolysates. **Food Tech.**, v. 48, n. 10, p. 96-8, 1994.
- [23] 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.
- [24] PETRUCCELLI, S. & ANÓN, M.C. Thermal aggregation of soy protein isolates. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, n. 12, p. 3035-41, 1995.

- [25] 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. 159 p.
- [26] 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.
- [27] 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. 108 p.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [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] TORUN, B.; VITERI, F.E.; YOUNG, V.R. Nutritional role of soy protein for humans. **J. Amer. Oil Chem. Soc.**, v. 58, n. 3, p. 400-6, 1981.
- [34] 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.
- [35] WHITAKER, J.R. Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on sephadex. **Anal. Chem.**, v. 35, p. 1950-53, 1963.
- [36] 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.
- [37] YAMASHITA, M.; ARAI, S.; FUJIMAKI, M. Plastein reaction for food protein improvement. **J. Agric. Food Chem.**, v. 24, p. 1100-4, 1976.
- [38] 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.
- [39] 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.