

# CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DE PESCADO<sup>1</sup>

R.A.M. NEVES<sup>2</sup>, N.V.M. DE MIRA<sup>2</sup>, U.M. Lanfer MARQUEZ<sup>2,\*</sup>

## RESUMO

Hidrolisados enzimáticos são utilizados no tratamento clínico de pacientes com dificuldade em digerir e absorver proteínas, sendo preferidos em relação às misturas de aminoácidos livres. Neste trabalho foram caracterizados quimicamente seis hidrolisados de *minced* de pescado, obtidos pelo emprego de diferentes sistemas enzimáticos, quanto à extensão da hidrólise, distribuição de peso molecular dos peptídeos, composição química e perfil de aminoácidos. A hidrólise resultou na solubilização de 63,4 a 94,2% das proteínas, sendo esta diretamente proporcional ao grau de hidrólise e dependente do sistema enzimático e das variáveis do processo (relação enzima/substrato e atividade enzimática). A composição dos hidrolisados atendeu à recomendação de ingestão dietética para aminoácidos essenciais, tanto para crianças como para adultos. A relação entre a concentração de aminoácidos ramificados e aromáticos (*Relação de Fischer*) resultou em valores superiores a 3,5 indicando que os hidrolisados obtidos podem ser úteis para a manutenção dietética de pacientes com doenças hepáticas crônicas. Os hidrolisados forneceram peptídeos com pesos moleculares bem definidos, destacando-se o obtido com pepsina e protease de *Streptomyces griseus*, que apresentou 57% de peptídeos menores do que 3 kDa, adequado para o uso em formulações hipoalergênicas.

**Palavras-chave:** minced de peixe; hidrolisados enzimáticos; ultrafiltração; composição em aminoácidos.

## SUMMARY

CHARACTERIZATION OF ENZYMATIC FISH HYDROLYSATES. Enzymatic hydrolysates have been used in the clinical treatment of patients with protein digestion and absorption impairment and have been preferred to mixtures of free amino acids. In this present work, six protein hydrolysates of minced fish, obtained by distinct enzymatic systems were characterized regarding the extent of hydrolysis, distribution of molecular size of peptides, chemical composition and amino acids profiles. The hydrolysis resulted in solubilization of 63,4% to 94,2% of proteins according to the enzymes used and process variables (enzyme substrate ratio and enzyme activity) and was proportional to the degree of hydrolysis. The composition of all the hydrolysates attends the dietary reference intakes for essential amino acids established for adults and infant nutrition. The ratio between the concentration of branched chain and aromatic amino acids (*Fischer Ratio*) was higher than 3,5 indicating that the hydrolysates obtained could be useful for dietetic management of patients with chronic liver diseases. The hydrolysates were composed of peptides with fairly defined molecular weights, highlighting the hydrolysate obtained by pepsin and *Streptomyces griseus* protease which showed a high percentage (57%) of peptides smaller than 3kDa suitable for use in hypoallergenic formulas.

**Keywords:** minced fish; enzymatic hydrolysate; ultrafiltration; amino acids profile.

## 1 – INTRODUÇÃO

Usualmente são empregadas fórmulas sintéticas constituídas de misturas de aminoácidos livres ou hidrolisados protéicos contendo peptídeos de baixo peso molecular, de preferência di e tripeptídeos, para o tratamento clínico de pacientes que apresentam complicações gastrointestinais, desnutrição decorrente de processos tumorais, queimaduras ou outros traumas, diarreia aguda ou crônica, alergias alimentares, ou distúrbios no metabolismo de aminoácidos, como na fenilcetonúria [8, 10, 18, 30, 31, 37].

Na alimentação enteral dá-se preferência aos hidrolisados protéicos, ricos em peptídeos de baixo peso molecular, devido à excelente absorção gastrointestinal e a sua baixa osmolalidade, sendo estes melhor utilizados pelo organismo do que as proteínas intactas ou os aminoácidos livres [2, 4, 39, 44].

Um outro campo de estudo e de aplicação para os hidrolisados protéicos é a obtenção de peptídeos pequenos, biologicamente ativos, os quais podem desempenhar várias funções, regulando ou inibindo a atividade enzimática, atuando como antibióticos, hormônios, agentes antivirais e antibacterianos ou imunomoduladores [19, 35].

A aplicação dos hidrolisados varia em função da distribuição do peso molecular dos peptídeos. Assim, peptídeos com pesos moleculares entre 5 e 20kDa são utilizados geralmente como fontes de nitrogênio, em alimentos para fins especiais e suplementos alimentares para adultos. Já, peptídeos com pesos moleculares menores que 5kDa são oriundos de proteínas altamente hidrolisadas sendo freqüentemente utilizados em formulações hipoalergênicas [29].

Formulações à base de hidrolisados protéicos com alto teor de aminoácidos ramificados (ACR), valina, leucina e isoleucina, e com um baixo conteúdo em aminoácidos aromáticos (AA), fenilalanina e tirosina, podem ser empregadas com sucesso no tratamento dietético de pacientes com lesões hepáticas crônicas, incluindo a encefalopatia hepática. Observou-se que uma relação ACR/AA, denominada de "*Relação de Fischer*" maior que 3,0 contribui para melhoria significativa no quadro clínico dos pacientes, atribuída à normalização da concen-

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 28/11/2002. Aceito para publicação em 25/11/2003 (001014).

<sup>2</sup> Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, Caixa Postal 66083, CEP 05315-970, São Paulo, SP. E-mail: lanferum@usp.br

\*A quem a correspondência deve ser enviada.

tração plasmática de aminoácidos e à manutenção de um aporte protéico adequado [1, 7, 14, 15, 42].

As proteínas mais comumente usadas para a produção de hidrolizados protéicos são as derivadas do leite (caseína, lactoalbumina e as proteínas do soro), soja, carne e pescado [17, 23].

As proteínas musculares do pescado apresentam a vantagem de possuírem um elevado valor biológico, decorrente de uma alta sensibilidade à hidrólise e de uma composição balanceada em aminoácidos, particularmente daqueles que costumam ser os limitantes em proteínas de origem vegetal, como a metionina e a cisteína. Outra vantagem do uso de pescado é o fato das espécies utilizadas serem pouco adequadas para filetagem e de menor valor comercial [6].

A hidrólise enzimática por ser realizada em condições brandas e controladas, garante a manutenção da qualidade nutricional dos hidrolizados e um perfil peptídico definido e reproduzível. O grau de hidrólise (GH) é o parâmetro utilizado para comparar hidrolizados protéicos entre si [3, 23, 28, 39].

A separação de frações peptídicas por faixas de pesos moleculares é realizada comumente por processos de ultrafiltração (UF), utilizando-se membranas de exclusão molecular [7, 9, 34, 36]. O processo de ultrafiltração é mais simplificado e de menor custo que a separação cromatográfica na produção em larga escala de frações peptídicas com características desejáveis [22].

No presente trabalho foram obtidos e caracterizados seis hidrolizados enzimáticos de *minced* de pescado, no que diz respeito a aspectos químicos, físico-químicos e nutricionais.

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – Material

#### 2.1.1 – *Minced* de pescado

Foi produzido pela TAKAKI Cia. Ltda.(Suzano, SP), a partir da mistura de duas espécies de água salgada – Maria Luiza (*Paralonchurus brasiliensis*) e Perna-de-Moça (*Cynoscion* sp) e Camarão-rosa (*Penaeus brasiliensis* e *Penaeus pauliensis*), sem exoesqueleto, pele e vísceras, lavado com água (três ciclos de lavagens), prensado para a remoção da água e sem adição de crioprotetores. A proporção entre as espécies não obedeceu a uma relação fixa, sendo feita de acordo com a oferta comercial, tendo havido sempre predominância de “Maria Luiza”.

As amostras foram homogeneizadas (OMNI TH-30000 rpm, Gainesville, USA), liofilizadas (Supermodulyo E-C, Crawley, UK) e mantidas a  $-15^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso.

#### 2.1.2 – Reagentes

As enzimas, protease fúngica de *Aspergillus oryzae* tipo II (0,6U/mg sólido), pepsina (mucosa de estômago de porco, 1:60000, 2100-2800U/mg sólido), pepsina (mucosa de estômago de porco, 1:10000, 800-2500U/mg

proteína), protease bacteriana de *Streptomyces griseus* (tipo XIV, 4U/mg sólido),  $\alpha$ -quimotripsina (pâncreas bovino, tipo II, 40-60U/mg proteína) e bromelina (extraída de abacaxi, 1190U/mg sólido), foram adquiridas da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

### 2.2 – Métodos

#### 2.2.1 – Hidrolizados enzimáticos

Foram preparados seis hidrolizados, em triplicata, segundo DE MIRA [12]. O *minced* liofilizado foi ressuspenso em água destilada (1:20, p/v) e submetido a tratamento térmico em banho-maria fervente por 30 minutos, para a desnaturação de proteínas e inativação de enzimas endógenas ainda presentes, sendo em seguida, resfriado em banho-de-gelo. A hidrólise foi realizada utilizando sistemas seqüenciais de duas enzimas com especificidades diferentes, de modo que, pelo menos uma delas fosse específica para aminoácidos aromáticos (pepsina, bromelina e  $\alpha$ -quimotripsina) e a outra, com menor especificidade. As hidrólises foram realizadas nas condições ótimas de temperatura e pH para cada enzima, conforme a Tabela 1. O pH foi ajustado com soluções de NaOH 1 N ou HCl 1N antes da hidrólise.

**TABELA 1.** Sistemas enzimáticos de hidrólise.

Enzimas	[E]:[S] <sup>a</sup>	Condições		
		pH <sup>b</sup>	T °C <sup>c</sup>	Tempo(h) <sup>d</sup>
H1- Pepsina 1:10.000/ Bromelina	1:100	2,0 / 4,5	45/45	3 / 2
H2- Pepsina 1:60.000/ Bromelina	1:100	2,0 / 4,5	45/45	3 / 2
H3- Pepsina 1:10.000/ Quimotripsina	1:100	2,0 / 8,0	37/45	3 / 2
H4- Pepsina 1:10.000/ <i>Aspergillus oryzae</i>	1:100	2,0 / 8,0	37/45	3 / 2
H5- Pepsina 1:60.000/ <i>Streptomyces griseus</i>	1:100	2,0 / 6,0	37/37	3 / 2
H6- Pepsina 1:10.000/ <i>Streptomyces griseus</i>	1:100 / 1:200	2,0 / 6,0	37/37	3 / 2

<sup>a</sup>Relação enzima:substrato (p/p); <sup>b</sup>pH ótimo das enzimas: pepsina (2,0), bromelina (4,5), quimotripsina (8,0), *Aspergillus oryzae* (8,0) e *Streptomyces griseus* (6,0); <sup>c</sup>Temperatura utilizada para a ação de cada uma das enzimas; <sup>d</sup>Tempo total de hidrólise igual a 5 horas, correspondente a 3 horas para a pepsina e as duas horas subsequentes para as demais enzimas.

Durante a hidrólise, as amostras foram mantidas sob agitação lenta (110rpm/min) em agitador de frascos (Julabo, SW 20, Seelbach, Ger). As enzimas utilizadas nas primeiras três horas de hidrólise foram a pepsina 1:10.000 ou a pepsina 1:60.000. As demais foram acrescentadas após a ação da pepsina, alterando-se o pH e a temperatura para as condições ideais da segunda enzima (Tabela 1). Após cinco horas, a hidrólise foi interrompida por aquecimento em banho-maria fervente, por 10min, para a inativação das enzimas. Os hidrolizados foram centrifugados (13292 x g, por 40min, centrífuga Sorvall, RC-5B, Newtown, USA) e os sobrenadantes liofilizados e armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ , até o momento das análises. Os precipitados foram secos em estufa ventilada a  $60^{\circ}\text{C}$ , analisados quanto ao teor de nitrogênio, calculando-se a partir deste dado, a porcentagem de proteína recuperada. A porcentagem de

proteína recuperada foi determinada pela quantificação do nitrogênio no precipitado.

### 2.2.2 - Grau de hidrólise

O grau de hidrólise (GH) foi definido como sendo o número de aminoácidos livres formado durante o rompimento das ligações peptídicas, em relação ao número total de aminoácidos existente na amostra, como apresentado pela equação:

$GH (\%) = [(equivalentes \text{ leucina após hidrólise enzimática} / equivalentes \text{ leucina na amostra após hidrólise ácida total}) \times 100]$  [21, 25].

### 2.2.3 - Peso molecular das frações peptídicas

A separação das frações peptídicas por faixa de peso molecular foi realizada por ultracentrifugação, em membranas de exclusão molecular de 30kDa, 10kDa e 3kDa, utilizando "Centricon Concentrators" (Amicon, Beverly, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As frações correspondentes foram denominadas A (peso molecular maior que 30kDa), B (peso molecular entre 10 e 30kDa), C (peso molecular entre 3 e 10kDa) e D (peso molecular menor que 3kDa).

### 2.2.4 - $\alpha$ -aminonitrogênio

A concentração de amino grupos livres foi determinada pela reação com ninidrina, conforme o método descrito por HOLT & SOSULSKI [20], com algumas pequenas modificações. Acrescentou-se a 0,1mL da amostra, 1,0mL de solução de ninidrina e os tubos foram mantidos em banho-maria fervente por exatamente 20 minutos, sendo resfriados, a seguir, em banho-de-gelo. Adicionaram-se 5,0mL de etanol a 50%, agitando os tubos vigorosamente e a absorbância foi lida a 570nm em espectrofotômetro (Beckman DU-70<sup>®</sup>, Muskegon, USA), contra um branco, até 30 minutos após a adição de etanol. A L-Leucina em diferentes concentrações (0,5 a 2,0 = mM) foi utilizada para a construção da curva-padrão. Os resultados foram expressos em mmoles de equivalentes de leucina por g de proteína.

### 2.2.5 - Análise de aminoácidos

A análise de aminoácidos foi realizada após hidrólise com HCl 6N, por 22 horas, a 110°C, em ampolas de vidro seladas a fogo sob vácuo. A seguir, as ampolas foram abertas e o HCl removido por evaporação, em dessecador mantido sob vácuo, contendo pastilhas de NaOH. O resíduo seco foi ressuspenso em tampão citrato pH 2,2 (Na-S, Beckman Coulter, Fullerton, USA). As amostras foram filtradas em membranas de 0,22 $\mu$ m, convenientemente diluídas com tampão citrato [40] e analisadas por cromatografia em troca iônica em autoanalisador de aminoácidos marca Beckman, modelo 7300 (Beckman Instr., Palo Alto, USA).

### 2.2.6 - Composição química dos hidrolizados

Os teores de proteína (N x 6,25), lipídeos, umidade e cinzas foram determinados na amostra de *minced* ori-

ginal e em todos os hidrolizados liofilizados, de acordo com a AOAC [5].

### 2.2.7- Relação de Fischer

Nos hidrolizados, assim como no *minced* foi calculada a *Relação de Fischer*, segundo FISCHER et al. [15], pela somatória dos aminoácidos de cadeia ramificada (isoleucina, leucina e valina) dividido pela somatória dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina), segundo a equação:

$$\text{Relação de Fischer} = [(VAL + LEU + ILEU) / (PHE + TYR)]$$

Os resultados foram expressos em mmoles de aminoácidos/100g de proteína.

## 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 - Composição química do *minced* e dos hidrolizados liofilizados

Os teores protéicos dos hidrolizados foram inferiores aos do *minced* e semelhantes entre si, variando entre 75 e 81,4%, como pode-se observar na *Tabela 2*. A diferença corresponde à proteína que não foi hidrolisada, permanecendo insolúvel. Os reduzidos teores de lipídios encontrados nos hidrolizados inferior ao do *minced*, constitui um aspecto favorável em relação à oxidação lipídica e à estabilidade durante o armazenamento [21, 27, 38, 41].

**TABELA 2.** Composição química do *minced* e dos hidrolizados do *minced* liofilizados

g/100g	Minced	Hidrolizados					
		H1	H2	H3	H4	H5	H6
Proteína (Nx6,25)	87,5 $\pm$ 2,5	75,0 $\pm$ 0,4	79,1 $\pm$ 0,1	78,9 $\pm$ 0,8	75,5 $\pm$ 0,1	76,0 $\pm$ 0,0	81,4 $\pm$ 0,4
Lipídios	2,2 $\pm$ 0,9	0,9 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,0	1,8 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,4
Cinzas	2,7 $\pm$ 0,5	14,9 $\pm$ 0,0	17,2 $\pm$ 0,4	14,7 $\pm$ 0,0	18,1 $\pm$ 0,3	18,7 $\pm$ 0,2	10,7 $\pm$ 0,3

Resultados (g/100g base seca) correspondem à média e ao desvio padrão (n=30).

A elevada concentração de cinzas verificada nos hidrolizados, de 10,7 a 18,7%, é decorrente da formação de NaCl em razão do ajuste do pH durante a hidrólise enzimática das proteínas. Elevados teores de minerais também foram encontrados por LICEAGA-GESUALDO & LI-CHAN [25], em hidrolizados protéicos de arenque (21,7%) e por DINIZ & MARTIN [13], em estudo realizado com cação (14,0%).

### 3.2 - Distribuição da proteína e grau de hidrólise

Na *Tabela 3* é apresentada a distribuição das frações protéicas, solúvel e insolúvel, bem como o grau de hidrólise. A porcentagem de proteína solúvel recuperada nos hidrolizados, em comparação ao teor protéico do *minced*, foi considerada como sendo o rendimento.

Apesar do rendimento dos hidrolizados depender de diversos fatores, a especificidade da enzima e a sua atividade específica tiveram efeito pronunciado, tanto sobre a solubilização como outras características. A reduzida recuperação protéica observada nos H1 e H2 em comparação a dos H5 e H6, ocorreu provavelmente devido à especificidade das enzimas utilizadas. A pepsina e a bromelina (H1 e H2) possuem uma alta especificidade para os aminoácidos aromáticos, enquanto a protease de *Streptomyces griseus* (H5 e H6) é uma enzima de ação inespecífica.

**TABELA 3.** Distribuição das frações protéicas, solúvel e insolúvel, e grau de hidrólise em cada sistema enzimático.

Sistemas enzimáticos	% Proteína solúvel	% Proteína insolúvel	% GH
H1 – Pepsina / Bromelina	75,7 ± 0,9	24,4 ± 0,9	8,1
H2 – Pepsina / Bromelina	63,4 ± 4,8	36,6 ± 4,8	9,3
H3 – Pepsina / Quimotripsina	84,2 ± 0,1	15,8 ± 0,1	9,8
H4 – Pepsina / <i>Aspergillus oryzae</i>	63,7 ± 2,4	36,4 ± 2,4	7,8
H5 – Pepsina / <i>Streptomyces griseus</i>	94,2 ± 0,8	5,9 ± 0,8	33,3
H6 – Pepsina / <i>Streptomyces griseus</i>	89,0 ± 0,6	11,0 ± 0,6	17,2

Resultados correspondem à média e ao desvio padrão dos valores em triplicata.

A taxa de solubilização das proteínas foi diretamente proporcional ao grau de hidrólise, fato observado por outros autores, que o relacionaram de forma positiva. A única exceção foi o H2, que apesar do grau de hidrólise ter sido maior que o do H1, apresentou menor solubilidade, indicando que o sistema enzimático utilizado produziu peptídios que não eram suficientemente pequenos para serem solubilizados [23, 24, 28]. A maior atividade enzimática da pepsina 1:60.000 no H2 em relação à pepsina 1:10.000 empregada no H1, pode explicar a diferença obtida no grau de hidrólise.

O H3 apresentou um bom rendimento em proteína solúvel quando comparado aos H1, H2 e H4, indicando que, apesar da enzima quimotripsina (específica para aminoácidos aromáticos) ter sido responsável por um reduzido GH foi capaz de solubilizar grande parte da proteína original, dando origem a peptídios solúveis, de peso molecular relativamente elevado. Assim, o emprego deste sistema enzimático pode ser útil quando se pretende obter um produto com reduzido GH.

O H4, proveniente da ação das enzimas pepsina e *Aspergillus oryzae*, esta última de reduzida especificidade, resultou numa recuperação de apenas 64% de peptídios solúveis, na grande maioria acima de 30kDa. Este resultado provavelmente se deve a menor atividade específica da enzima de *Aspergillus oryzae*.

Os H5 e H6 apresentaram rendimentos mais elevados, podendo a diferença no grau de hidrólise ser atribuída à relação E/S que no H5 foi de 1:100 e no H6 de 1/200. A atividade da pepsina utilizada nesses hidrolizados H5 e H6 também parece ter sido responsável pela diferença no grau de hidrólise. A pepsina 1:60.000, de maior atividade, foi utilizada no hidrolizado H5, resul-

tando em um alto grau de hidrólise e rendimento de 94,2% de proteína hidrolisada.

### 3.3 – Composição em aminoácidos dos hidrolizados e comparação com as recomendações da Food and Nutrition Board (FNB) / Institute of Medicine (IOM)

O perfil de aminoácidos essenciais do *minced* atende as recomendações estabelecidas pela FNB/IOM [16] e publicadas em 2002, tanto para crianças como para adultos (Tabela 4).

**TABELA 4.** Conteúdo de aminoácidos no *minced* e nos hidrolizados em comparação às recomendações de aminoácidos essenciais da FNB/IOM [16].

Aminoácidos	<i>Minced</i>		Hidrolizados enzimáticos						FNB/IOM	
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	(g aminoácidos / 100g proteína)			
							Crianças	Adultos		
Ac. Aspártico	7,3	10,5	10,6	10,9	11,1	10,8	11,0			
Treonina	6,1	4,7	4,7	4,8	4,8	4,8	4,9	2,7	2,4	
Serina	4,2	3,9	3,9	3,9	3,9	4,0	3,9			
Ac. Glutâmico	14,7	19,6	19,5	19,5	21,1	18,9	19,8			
Prolina	6,7	3,5	3,4	3,2	3,1	3,3	3,3			
Glicina	3,4	4,4	4,2	4,0	4,2	4,2	4,2			
Alanina	6,1	6,9	6,8	6,5	7,1	6,5	6,8			
Valina	5,3	5,2	5,2	5,3	5,1	5,4	5,1	3,2	2,9	
Metionina	3,5	3,0	3,1	3,1	2,3	3,0	2,6	2,5 <sup>a</sup>	2,3 <sup>a</sup>	
Isoleucina	4,8	4,1	4,4	4,7	4,4	5,0	4,8	2,5	2,3	
Leucina	8,8	8,5	8,6	8,6	8,7	8,7	8,7	5,5	5,2	
Tirosina	4,0	2,9	3,3	3,5	2,7	3,6	3,2			
Fenilalanina	4,2	3,1	3,3	3,6	2,9	3,8	3,4			
Tirosina + Fenilalanina	8,2	6,0	6,6	7,1	5,6	7,4	6,6	4,7	4,1	
Histidina	3,1	2,2	2,2	2,2	2,1	2,1	2,1	1,8	1,7	
Triptofano	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,8	0,6	
Lisina	10,3	10,6	10,4	9,9	10,2	9,8	10,1	5,1	4,7	
Arginina	7,6	6,8	6,5	6,2	6,3	6,2	6,3			

<sup>a</sup>Soma de metionina + cistina; resultados correspondem à média dos valores obtidos em duplicata.

As variações observadas na composição de aminoácidos dos hidrolizados em relação ao *minced* que lhes deu origem, podem ser decorrentes da distribuição variável dos aminoácidos entre o hidrolizado e o resíduo protéico insolúvel. De acordo com NETTO & GALEAZZI [32], o tratamento térmico utilizado para inativar as enzimas, ao final do processo de hidrólise, também pode ter contribuído na alteração da distribuição dos aminoácidos entre a fração protéica solúvel e insolúvel. A redução no conteúdo da arginina, fenilalanina, histidina, metionina, prolina, serina, tirosina e treonina, todavia, não comprometeu a qualidade nutricional dos hidrolizados, uma vez que a concentração de aminoácidos essenciais continua atendendo às recomendações estabelecidas pela FNB/IOM [16]. A redução na concentração de fenilalanina, verificada no hidrolizado H4, pode até ser benéfica, quando o objetivo for à obtenção de um hidrolizado para pacientes fenilcetonúricos.

### 3.4 – Relação de Fischer

A Relação de Fischer calculada para o *minced* e os hidrolizados é apresentada na Tabela 5. A concentração

molar dos aminoácidos foi calculada, segundo FISCHER et al. [15], a partir das concentrações em aminoácidos da Tabela 4. Os hidrolizados apresentaram um enriquecimento em ACR e uma redução em AA, em relação ao *minced*, embora variável, de acordo com o sistema enzimático utilizado.

**TABELA 5.** Relação de Fischer calculada para o *minced* e os hidrolizados

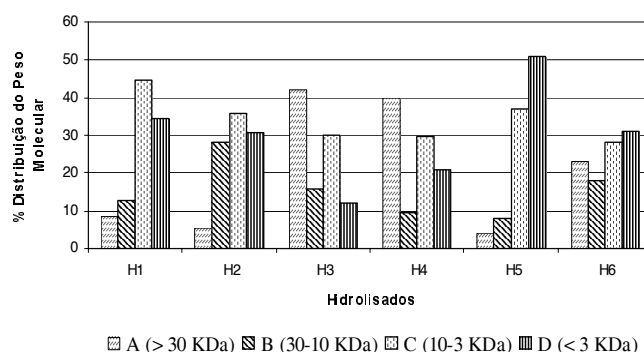
Aminoácidos	Minced	Hidrolizados enzimáticos					
		H1	H2	H3	H4	H5	H6
(mmoles aminoácidos / 100g proteína)							
<b>Aminoácidos de Cadeia Ramificada</b>							
Isoleucina	36,6	31,3	33,6	35,9	33,6	38,2	36,6
Leucina	67,2	64,9	65,6	65,6	66,4	66,4	66,4
Valina	45,3	44,4	44,4	45,3	43,6	46,2	43,6
<b>Aminoácidos Aromáticos (AA)</b>							
Fenilalanina	25,5	18,8	20,0	21,8	17,6	23,0	20,6
Tirosina	22,1	16,0	18,2	19,3	14,9	19,9	17,7
ACR totais	149,1	140,6	143,7	146,8	143,6	150,7	146,6
AA totais	47,6	34,8	38,2	41,2	32,5	42,9	38,3
Relação de Fischer	3,1	4,0	3,8	3,6	4,4	3,5	3,8

A Relação de Fischer encontrada no plasma humano, de cães e de ratos é de aproximadamente 3,0. Entretanto, em indivíduos com quadro clínico característico de encefalopatia hepática, pode ser observada uma diminuição para cerca de 1,0. Estes pacientes se beneficiam com proteínas contendo peptídeos curtos e uma Relação de Fischer elevada. Hidrolizados enzimáticos com uma Relação de Fischer igual ou maior que três (3,0) podem ser utilizados no tratamento destes pacientes, contribuindo para a normalização da concentração molar plasmática dos aminoácidos [15]. Os hidrolizados obtidos no presente trabalho apresentaram uma Relação de Fischer igual ou superior a 3,5, sendo de interesse especial para o tratamento clínico de doenças hepáticas. O *minced* com uma Relação de Fischer igual a 3,0 pode também ser empregado, garantindo um aporte protéico adequado.

### 3.5 - Distribuição percentual do peso molecular dos peptídeos nos hidrolizados

Os hidrolizados submetidos à ultrafiltração resultaram em quatro frações (A, B, C e D), de acordo com a sua distribuição de pesos moleculares. Foi denominada fração (A) aquela com peptídeos de peso molecular maior que 30kDa, fração (B) a com peso molecular entre 10 e 30kDa, fração (C) a com peso molecular entre 3 e 10kDa, e fração (D) a com peptídeos menores que 3kDa.

De acordo com a Figura 1, os hidrolizados H1 e H2 mostraram perfis de certa forma semelhantes entre si, predominando peptídeos com pesos moleculares inferiores a 10kDa. A maior atividade da pepsina (1:60.000) que originou o H2 resultou em maior quantidade de peptídeos com pesos moleculares entre 30 e 10, em relação ao H1. Estes peptídeos, eventualmente, poderiam ter sido hidrolizados pela segunda enzima, a bromelina, se o período de incubação tivesse sido maior.



**FIGURA 1.** Distribuição percentual do peso molecular dos peptídeos nos hidrolizados enzimáticos

No H3, a ação da pepsina seguida de quimotripsina, resultou na predominância de peptídeos de alto peso molecular, sendo que 42% possui peso molecular igual ou superior a 30kDa. Este perfil pode ser explicado pela especificidade de ambas as enzimas por ligações peptídicas adjacentes a aminoácidos aromáticos, leucina, ácido aspártico e ácido glutâmico.

O H4 (pepsina/*Aspergillus oryzae*) apresentou pesos moleculares extremos: 50% de peptídeos com peso molecular inferior a 10kDa, e 39% de peptídeos com peso molecular igual ou superior a 30kDa, indicando ter ocorrido uma extensa hidrólise possivelmente na porção mais externa da proteína, restando uma porção central resistente à protease do *Aspergillus oryzae*.

A protease de *Streptomyces griseus* é inespecífica. Por isso, o H5, obtido pela ação da pepsina seguida da referida enzima, além do elevado grau de hidrólise, da ordem de 33%, apresentou também a maior porcentagem de pequenos peptídeos e de aminoácidos livres, sendo que 86% do hidrolizado corresponde a pesos moleculares inferiores a 10kDa, e destes, 51% a pesos moleculares inferiores a 3kDa. Somando-se a isso, observou-se que a ação combinada da pepsina 1:60.000 e protease de *Streptomyces griseus* foi capaz de hidrolisar quase toda a proteína.

Devido ao elevado custo, a enzima proveniente de *Streptomyces griseus* foi testada em menor concentração no H6. Foi observada uma queda de aproximadamente 50% no GH, proporcional à redução na concentração da enzima. Houve mudança no perfil de distribuição dos pesos moleculares, com aumento dos peptídeos com peso molecular superior a 30kDa e diminuição significativa na concentração de pequenos peptídeos e aminoácidos livres.

### 3.6 - Perfil de aminoácidos das frações peptídicas dos diversos hidrolizados enzimáticos

Foi analisado o perfil de aminoácidos das quatro frações peptídicas obtidas em cada hidrolizado, com o intuito de verificar se estas apresentavam uma composição semelhante a do hidrolizado total.

De uma maneira geral, o perfil de aminoácidos de cada fração de peso molecular distinto foi semelhante

ao do hidrolisado enzimático correspondente, segundo as Tabelas 6 e 7.

**TABELA 6.** Distribuição percentual de aminoácidos no hidrolisado total e nas frações peptídicas A, B, C e D dos hidrolisados H1, H2 e H3<sup>1</sup>.

Aminoácidos	H1				H2				H3						
	(Pepsina 1:10.000/ Bromelina)				(Pepsina 1:60.000/ Bromelina)				(Pepsina 1:10.000/ Quimotripsina)						
	%				%				%						
	H1	A	B	C	D	H2	A	B	C	D	H3	A	B	C	D
Ac. Aspártico	10,2	10,3	9,7	10,6	9,2	10,3	10,4	10,3	10,6	9,5	10,7	10,3	11,0	11,5	9,1
Treonina	5,1	4,8	4,5	4,7	4,8	5,1	4,9	4,7	4,6	5,1	5,2	4,9	4,1	5,3	5,1
Serina	4,8	5,1	4,8	4,8	4,9	4,8	5,2	4,4	5,3	5,1	4,8	5,1	5,0	4,1	6,1
Ac. Glutâmico	17,2	17,2	15,8	17,0	17,0	17,1	17,1	16,6	16,9	17,3	17,2	16,3	18,3	18,6	13,6
Prolina	4,0	5,3	4,4	4,8	3,4	3,8	5,2	4,0	6,4	3,6	3,6	5,9	3,7	1,5	n.d.
Glicina	7,6	7,5	7,5	7,6	7,3	7,2	7,1	7,6	6,6	7,0	6,8	7,1	5,9	7,8	5,6
Alanina	9,9	9,7	8,9	9,8	10,3	9,8	9,3	9,5	9,4	10,5	9,5	9,6	7,8	10,3	8,8
Valina	5,7	5,3	5,4	5,1	5,5	5,7	5,4	5,3	5,3	5,7	5,8	5,0	6,0	5,3	5,8
Metionina	2,6	2,6	2,0	2,8	3,0	2,6	2,7	2,6	2,7	3,1	2,6	1,7	4,4	3,1	3,8
Isoleucina	4,1	3,9	3,5	3,8	3,7	4,4	4,2	4,0	4,2	4,0	4,6	4,0	4,6	4,4	4,1
Leucina	8,3	8,1	7,1	8,0	8,7	8,4	8,3	7,8	8,4	9,3	8,5	7,9	8,6	8,5	9,3
Tirosina	2,1	2,3	2,0	2,2	2,4	2,3	2,4	2,4	2,4	2,7	2,5	2,4	2,5	2,7	3,6
Fenilalanina	2,4	2,4	2,1	2,4	2,6	2,6	2,6	2,5	2,6	2,9	2,8	2,6	2,4	2,8	4,1
Histidina	1,8	1,4	n.d.	2,4	4,6	1,8	1,4	5,0	0,3	1,6	1,9	4,0	2,6	n.d.	n.d.
Lisina	9,4	9,2	8,5	9,2	7,8	9,1	9,0	8,7	9,5	7,7	8,8	8,6	8,7	8,8	6,4
Arginina	5,0	5,0	4,0	5,0	4,9	4,8	4,9	4,6	5,0	4,9	4,6	4,6	4,4	5,1	4,8

<sup>1</sup>Resultados expressos em % de cada aminoácido em relação ao conteúdo total de aminoácidos na fração analisada; n.d.= não determinado

**TABELA 7.** Distribuição percentual de aminoácidos no hidrolisado total e nas frações peptídicas A, B, C e D dos hidrolisados H4, H5 e H6<sup>1</sup>.

Aminoácidos	H4				H5				H6						
	(Pepsina 1:10.000/ <i>Aspergillus oryzae</i> )				(Pepsina 1:60.000/ <i>Streptomyces griseus</i> )				(Pepsina 1:10.000/ <i>Streptomyces griseus</i> )						
	%				%				%						
	H1	A	B	C	D	H2	A	B	C	D	H3	A	B	C	D
Ac. Aspártico	10,8	10,5	10,1	11,8	10,4	10,5	13,0	10,7	10,8	9,9	10,7	11,1	10,6	10,1	9,4
Treonina	5,2	4,6	4,3	5,2	4,6	5,2	5,0	4,5	4,9	4,5	5,3	5,2	4,6	4,2	5,1
Serina	4,8	4,9	4,8	4,9	4,7	4,9	5,1	4,1	4,5	4,2	4,8	5,1	4,9	5,6	5,0
Ac. Glutâmico	18,5	18,8	19,0	18,3	18,7	16,6	15,1	16,9	17,3	16,3	17,4	16,6	18,1	16,4	15,2
Prolina	3,4	4,2	3,1	3,9	3,7	3,7	6,6	6,5	3,5	4,0	3,6	5,0	6,1	6,3	3,4
Glicina	7,1	8,0	8,6	6,7	7,8	7,2	7,0	7,6	7,9	6,9	7,1	7,2	7,3	7,1	6,0
Alanina	10,2	9,8	10,3	9,7	9,6	9,4	8,5	9,1	9,3	9,4	9,9	9,0	9,7	9,9	9,4
Valina	5,6	5,0	4,1	5,4	5,4	6,0	5,4	5,9	5,6	6,5	5,7	4,9	5,1	5,9	5,6
Metionina	1,9	2,3	2,5	2,0	1,8	2,6	1,5	2,6	2,4	3,1	2,2	1,6	2,6	3,5	2,8
Isoleucina	4,3	3,8	2,9	4,2	3,8	4,9	4,5	4,9	4,5	5,2	4,7	4,1	4,2	4,0	4,5
Leucina	8,6	7,8	7,6	8,4	8,1	8,6	7,9	7,9	7,4	9,7	8,6	8,1	7,7	7,5	10,3
Tirosina	1,9	2,0	1,9	2,1	1,8	2,5	2,4	1,5	2,3	2,1	2,3	2,5	2,2	2,2	3,0
Fenilalanina	2,3	2,2	1,0	2,5	2,7	2,9	2,7	2,6	2,5	3,3	2,6	2,7	2,3	2,4	3,5
Histidina	1,8	1,6	3,4	0,5	1,8	1,8	1,6	2,2	4,6	1,7	1,7	3,8	1,2	1,7	3,9
Lisina	9,0	9,6	11,2	9,6	10,0	8,6	8,6	8,5	8,1	8,6	8,9	8,6	8,6	8,6	8,1
Arginina	4,6	5,0	5,0	4,8	5,1	4,6	4,8	4,6	4,4	4,6	4,7	4,8	4,9	4,6	4,7

<sup>1</sup>Resultados expressos em % de cada aminoácido em relação ao conteúdo total de aminoácidos na fração analisada; n.d.= não determinado

**3.7 – Teores de fenilalanina nas frações peptídicas dos seis hidrolisados**

Hidrolisados contendo baixos teores de fenilalanina beneficiam clinicamente pacientes com fenilcetonúria [11]. A distribuição e o conteúdo de fenilalanina nos hidrolisados e em suas frações isoladas estão apresentados na Tabela 8.

**TABELA 8.** Distribuição de fenilalanina (%) nos hidrolisados totais e nas frações peptídicas correspondentes<sup>1</sup>

Hidrolisados enzimáticos	Hidrolisados totais	Frações peptídicas			
		Peso Molecular (kDa)			
		A (>30)	B (30 – 10)	C (10 – 3)	D (<3)
H1	2,4	2,4	2,1	2,4	2,6
H2	2,6	2,6	2,5	2,6	2,9
H3	2,8	2,6	2,4	2,8	4,1
H4	2,3	2,2	1,0	2,5	2,7
H5	2,9	2,7	2,6	2,5	3,3
H6	2,6	2,7	2,3	2,4	3,5

<sup>1</sup>Resultados expressos em % de fenilalanina em relação ao conteúdo total de aminoácidos na fração analisada

As frações com pesos moleculares menores que 3kDa (fração D) provenientes dos H1 e H2 apresentaram uma pequena elevação na concentração de fenilalanina em relação aos hidrolisados correspondentes.

No H3, a fração D apresentou um enriquecimento na concentração de fenilalanina (4,1%), em relação ao hidrolisado total, enquanto nas demais frações houve uma pequena redução. A quimotripsina, por possuir uma maior afinidade por aminoácidos aromáticos, explica a maior liberação destes aminoácidos, apesar do baixo grau de hidrólise (9,8%), conforme Tabela 3, mostrando ser a mais indicada para liberar a fenilalanina. Este fato é especialmente importante quando se procura remover a fenilalanina da proteína. Contudo, devido ao reduzido grau de hidrólise, a fração < 3kDa representa aproximadamente 12% do hidrolisado total (Figura 1), não justificando, nestas condições, um processo tecnológico para a remoção da fenilalanina.

A fração B (30-10kDa) do H4 apresentou uma concentração de fenilalanina 50% inferior ao hidrolisado total, contudo o reduzido rendimento protéico dessa fração, em torno de 9%, limita a sua aplicação (Figura 1).

Nos H5 e H6, a fração menor que 3kDa correspondeu a 51 e 31% respectivamente do hidrolisado total e apresentou uma elevada concentração de fenilalanina. Neste caso, ao contrário do que ocorreu nos H3 e H4, o elevado grau de hidrólise (33 e 17%) parece ter sido responsável pela liberação da fenilalanina. Essa fração poderia ser submetida a um processo de remoção da fenilalanina e se tornar útil como fonte protéica para pacientes fenilcetonúricos. A cromatografia em gel por exclusão molecular com Sephadex-G15, por exemplo, poderia ser utilizada para remover a fenilalanina livre. Devido à natureza hidrofóbica do Sephadex-G15, a fenilalanina, tirosina e triptofano (aminoácidos com características hidrofóbicas) sofrem um retardo durante a eluição, levando a uma marcada redução no conteúdo destes aminoácidos [1, 4, 7, 42, 43].

O carvão ativo eventualmente poderia ser empregado como um meio de adsorção para separar as moléculas hidrofóbicas. Na literatura é descrito como sendo útil para reduzir o sabor amargo, remover impurezas e clarificar o hidrolisado, apesar de ser considerado um adsorvente inespecífico. [26, 33, 41].

#### 4 – CONCLUSÕES

O *minced* de pescado mostrou-se adequado na obtenção de hidrolizados enzimáticos com alto rendimento protéico. Os hidrolizados obtidos apresentaram diferentes características em relação ao grau de hidrólise, distribuição do peso molecular e perfil de aminoácidos, permitindo direcionar o seu uso para tratamentos dietéticos especiais. A relação entre a concentração de aminoácidos de cadeia ramificada (isoleucina, leucina e valina) e os aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina), denominada de Relação de Fischer, foi superior 3,5 em todos os hidrolizados, permitindo sua utilização no tratamento de doenças hepáticas crônicas. As frações peptídicas ricas em peptídios com reduzido peso molecular obtidas pela hidrólise com pepsina e protease de *Streptomyces griseus*, podem ser empregadas no tratamento de indivíduos com alergias alimentares.

#### 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADACHI, S.; KIMURA, Y.; MURAKAMI, K.; MATSUNO, R.; YOKOGOSHI, H. Separation of peptide groups with definite characteristics from enzymatic protein hydrolysate. **Agric. Biol. Chem.**, v.55, n.4, p. 925-932, 1991.
- [2] ADIBI, S.A. Glycyl-dipeptides: new substrates for protein nutrition. **J. Lab. Clin. Med.**, v.113, n.6, p.665-673, 1989.
- [3] ADLER-NISSEN, J. **Enzyme hydrolysis of food proteins**. Elsevier Applied Science Publishers, England., 1986, 427p.
- [4] ARAI, S.; MAEDA, A.M.; MATASUMURA, M.; HIRAO, N.; WATANABE, M. Enlarged-scale production of a low-phenylalanine peptide substance as a foodstuff for patients with phenylketonuria. **Agric. Biol. Chem.**, v.50, n.11, p.2929-2931, 1986.
- [5] AOAC – **Official methods of analysis**. 16<sup>a</sup> ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1995.
- [6] BÁRZANA, E.; GARIBAY-GARCÍA, M. Production of fish protein concentrates in **Fisheries processing: biotechnological applications**. MARTIN, A.M., Chapman&Hall, London, p.206-222, 1994.
- [7] BAUTISTA, J.; HERNANDEZ-PINZON, I.; ALAIZ, M.; PARRADO, J.; MILLAN, F. Low molecular weight sunflower protein hydrolysate with low concentration in aromatic amino acids. **J. Agric. Food Chem.**, v.4, p.967-971, 1996.
- [8] BUZINCO, L.; CANTANI, A.; LONGHI, M.A.; GIAMPIETRO, P.G. Anaphylactic reactions to cow's milk whey protein hydrolysate (Alpha-ré, Nestlé) in infant with cow's milk allergy. **Ann. Allergy**, v.62, p.333-335, 1989.
- [9] CALDERÓN DE LA BARCA, A.M.; 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, n.2, p.246-253, 2000.
- [10] CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends Food Sci. Technol.**, v.11, p.254-262, 2000.
- [11] CORDLE, C.T. Control of food allergies using protein hydrolysates. **Food Technol.**, v.48, n.10, p.72-76, 1994.
- [12] DE MIRA, N.V.M. **Utilização de surimi para a obtenção de Hidrolizados enzimáticos com baixo teor de fenilalanina**. Tese de Doutorado. 2001, 146p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas / Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Universidade de São Paulo, Brasil.
- [13] DINIZ, F.M.; MARTIN, A.M. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein. Composition of the hydrolysates. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v.48, p.191-200, 1997.
- [14] FISCHER, J.E.; BOWER, R.H. Nutritional support in liver disease. **Surg. Clin. North Am.**, v.61, n.3, p.653-660, 1981.
- [15] FISCHER, J.E.; ROSEN, H.M.; EBEID, A.M.; JAMES, J.H.; KEANE, J.M.; SOETERS, P.B. The effect of normalization of plasma amino acids on hepatic encephalopathy in man. **Surgery**, v.80, n.1, p.77-91, 1976.
- [16] FNB/IOM. Food and Nutrition Board / Institute of Medicine. Dietary reference intakes for energy, carbohydrates, fiber, fat, protein and amino acids (macronutrients). 936p. Disponível em [www.nap.edu](http://www.nap.edu). Acesso em 07/out./2002.
- [17] FREITAS, O.; PADOVAN, G.J.; VILELA, L.; SANTOS, J.E.D.; OLIVEIRA, J.E.D.; GREENE, L.J. Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition. **J. Agric. Food Chem.**, v.41, p.1432-1438, 1993.
- [18] FRØKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. **Food Technol.**, v.48, n.10, p.86-88, 1994.
- [19] GILL, I.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; JORBA, X.; VULFSON, E.N. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. **Enz. Microb. Technol.**, v.18, p.162-183, 1996.
- [20] HOLT, N.W.; SOLSULKI, F.W. Nonprotein nitrogen contents of some grain legumes. **Can. J. Plant Sci.**, v.61, p.515-523, 1981.
- [21] HOYLE, N.T.; MERRIT, J.H. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **J. Food Sci.**, v.59, n.1, p.76-79, 1994.
- [22] JEON, Y.J.; BYUN, H.G.; KIM, S.K. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. **Process Biochem.**, v.35, p.471-478, 1999.
- [23] LAHL, W.J.; BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technol.**, v.48, n.10, p.68-71, 1994.
- [24] LIASET, B.; LIED, E.; ESPE, M. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. **J. Sci. Food Agric.**, v.80, p.581-589, 2000.
- [25] LICEAGA-GESUALDO, A.M.; LI-CHAN, E.C.Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*clupea harengus*). **J. Food Sci.**, v.64, n.6, p.1000-1004, 1999.
- [26] LOPEZ-BAJONERO, L.J.; LARA-CALDERON, P.; GALVEZ-MARISCAL, A.; VELAZQUES-ARELLANO, A.; LOPEZ-MUNGUÍA, A. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. **J. Food Sci.**, v.56, n.4, p.938-942, 1991.
- [27] MACKIE, I.M. Fish protein hydrolysate. **Process Biochem.**, v.17, n.1, p.26-28, 1982.
- [28] 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.1223-1229, 1992.
- [29] MAHMOUD, M.I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technol.**, v.48, n.10, p.89-95, 1994.
- [30] MEREDITH, J.W.; DITESHEIM, J.A.; ZALOGA, G. Visceral protein levels in trauma patients are greater with peptide diet than with intact protein diet. **J. Trauma**, v.30, p.825-828, 1990.
- [31] MILLA, P.J.; KILBY, A.; RASSAN, U.B.; ERSSER, M.L.; HARRIRES, J.T. Small intestinal absorption of amino acids and a dipeptides in pancreatic insufficiency. **Gut.**, v.24, p.818-824, 1983.
- [32] NETTO, F.M.; GALEAZZI, M.A.M. Production and characterization of enzymatic hydrolysate from soy protein isolate. **Lebensm-Wiss Technol.**, v.31, p.624-631, 1998.
- [33] PEDERSEN B. Removing bitterness from protein hydrolysate. **Food Technol.**, v.48, n.10, p.96-98, 1994.
- [34] PEREA, A.; UGALDE, U.; RODRIGUEZ, I.; SERRA, J.L. Preparation and characterization of whey bioconversion processes. **Enzyme Microb. Technol.**, v.15, p.418-423, 1993.
- [35] PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. **Trends Food Sci. Technol.**, v.11, p.347-356, 2001.
- [36] POULIOT, Y.; WIJERS, M.C.; GAUTHIER, S.F.; NADEAU, L. Fractionation of whey protein hydrolysates using charged UF/NF membranes. **J. Membr. Sci.**, v.158, p.105-114, 1999.
- [37] SCHMIDL, M.K.; TAYLOR, S.L.; NORDLEE, J.A. Use of hydrolysate-based products in special medical diets. **Food Technol.**, v.48, n.10, p.77-85, 1994.
- [38] SHAHIDI, F.; HAN, X-Q; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chem.**, v.53, p.285-293, 1995.
- [39] SIEMENSMA, A.D.; WEIJER, W.J.; BAK, H.J. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. **Trends Food Sci. Technol.**, v.4, p.16-21, 1993.
- [40] SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, v.30, n.7, p.1190-1206, 1958.
- [41] SYNOWIECHI, J.; AL-KHATEEB, N.A.A.Q. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. **Food Chem.**, v.68, p.147-152, 2000.
- [42] TANIMOTO, S-Y; TANABE, S.; WATANABE, M.; ARAI, S. Enzymatic modification of zein to produce a non-bitter peptide fraction with a very high fischer ratio for patients with hepatic encephalopathy. **Agric. Biol. Chem.**, v.55, n.4, p.1119-1123, 1991.
- [43] YAMASHITA, M.; ARAI, S.; FUJIMARI, M. A low-phenylalanine, high-tyrosine plastein as an acceptable dietetic food. **J. Food. Sci.**, v.41, p.1029-1032, 1976.
- [44] ZIEGLER, F.; OLLIVIER, J.M.; CYNOBER, L.; MASINI, J.P.; COUDRAY-LUCAS, C.; LEVY, E.; GIBONDEAU, J. Efficacy of enteral nitrogen support in surgical patients; small peptides vs. Nondegraded proteins. **Gut.**, v.31, p.1277-1283, 1990.

## 6 – AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.