

GRAU DE HIDRÓLISE E SOLUBILIDADE DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DE CLARA DE OVO*

M.N.O. STABILE**
R. BARUFFALDI

Produziu-se um hidrolisado protéico em escala piloto a partir de clara de ovo em pó. O produto apresentou 87,0% de proteína, 5,5% de cinzas, 0,2% de lípidos e 4,6% de umidade. No decorrer do processo fez-se acompanhamento da solubilidade e do grau de hidrólise (GH) de proteínas sob ação de um sistema multienzimático constituído por papaína, tripsina e protease microbiana 2:1:2, usando-se uma relação enzima/proteína de 1:100. A reação ocorreu a valor de pH igual a 7,0 e temperatura de 50-60 C. A hidrólise aumentou a solubilidade das proteínas. A taxa máxima de hidrólise foi observada após 180 minutos correspondendo à 6,8% de GH. A análise dos produtos resultantes permitiu identificar aminoácidos na sua forma livre. O produto mostrou boa apresentação, estabilidade e também isento de contaminação.

1 INTRODUÇÃO

O grupo mais importante de enzimas para a indústria de alimentos é o das proteolíticas. Essas são usadas na produção de queijos, cervejas, carnes tenderizadas e cutras (10, 12, 15).

A enzima proteolítica hidrolisa as ligações peptídicas de proteína (12) ou então ataca apenas sítios disponíveis à sua ação de conformidade com sua especificidade.

A produção de hidrolisados pode servir a três propósitos distintos: modificação de propriedades funcionais de proteínas, obtenção de peptídeos e aminoácidos para uso em dietéticos, ou como agente flavorizante (10, 12).

A ação enzimática sobre as proteínas da clara de ovo vem sendo estudada amiúde (3, 6, 8, 9, 11, 14). O objetivo do presente é estudar o grau de hidrólise e a solubilidade dessa proteína sob ação de enzimas proteolíticas de fonte vegetal (papaína), microbiana (protease microbiana) e animal (tripsina).

* Trabalho apresentado no XI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Recife-PE, Agosto 1988.

** Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, FCF, USP.

2 MATERIAL, MÉTODOS E PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Material

Na preparação foi usada clara em pó de ovo de galinha fabricada pela indústria nacional e a venda no mercado.

Usou-se papaína, tripsina e protease microbiana conforme estão à venda no comércio. As enzimas foram associadas formando um "pool" na proporção 2:1:2 de papaína, tripsina e protease microbiana respectivamente, preparado em função de suas atividades. A relação enzima/proteína foi de 1:100.

O controle do processo foi feito com um refratômetro ATAGO, modelo CAT-325.

2.2 Métodos

2.2.1 Atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada pela digestão de uma solução de caseína, valor de pH 7,0, durante 5 minutos. Após precipitação e filtração, a caseína solúvel foi medida colorimetricamente. As atividades enzimáticas são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 - ATIVIDADE DAS ENZIMAS

Enzimas	Atividade (ug prot/ml.min)
Tripsina	97,4
Papaína	54,8
Protease microbiana	55,0

2.2.2 Composição centesimal

- . Teor de umidade - método gravimétrico segundo o Instituto Adolfo Lutz (7).
- . Teor de proteínas - micro-Kjeldahl segundo a Association of Official Analytical Chemists (2).
- . Extrato etéreo - extração com solvente, posterior vaporização e pesagem, segundo o Instituto Adolfo Lutz (7).
- . Cinzas - método gravimétrico após incineração a 550 C, segundo o Instituto Adolfo Lutz (7).

2.2.3 Determinação da concentração de sólidos solúveis

A determinação da concentração de sólidos solúveis foi feita por interpolação em uma curva padrão obtida gravimetricamente pela vaporização do solvente da solução.

2.2.4 Grau de hidrólise

O grau de hidrólise foi definido como:

$$\text{GH \%} = \frac{\text{concentração de sólidos solúveis} \cdot 100}{\text{teor inicial de proteína}}$$

2.2.5 Análise microbiológica

A análise microbiológica foi feita segundo os métodos preconizados pela American Public Health Association (1).

2.2.6 Fracionamento e identificação de aminoácidos

O hidrolisado foi fracionado por cromatografia em camada delgada sobre celulose microcristalina. Os cromatogramas desenvolveram-se em n-butanol:acetona:ácido acético:água, 35:35:10:20, volume a volume.

A visualização foi possível após vaporização de uma solução de acetato de cádmio a 5% em ninidrina etanólica. A identificação foi feita por comparação com uma solução contendo padrões de aminoácidos.

2.3 Parte experimental

Em escala piloto, foram preparadas suspensões de clara de ovo em pó a 10% de proteína (p/v) em tampão fosfato a um valor de pH igual a 7.0.

Aqueceu-se a 50-60 C após a estabilização da temperatura, adicionou-se a seco as enzimas papaína, tripsina e protease microbiana numa relação a 1% enzima/proteína.

Periodicamente retirava-se amostras e inativava-se por aquecimento a 100 C durante 20 minutos. Após a filtração, procedia-se às leituras em refratômetro.

Depois de terminado o processo o produto foi seco por aspersão ("spray-dryer").

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta os resultados da análise da composição centesimal da matéria-prima e de seu hidrolisado.

Os resultados mostram serem a matéria-prima e seu hidrolisado, produtos com altos teores de proteína. A clara de ovo em pó apresentou resultados semelhantes aos da literatura (5, 13).

Tabela 2 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA CLARA DE OVO EM PÓ E DE SEU HIDROLISADO

	Umidade (%)	Proteína (%)	Lípides (%)	Cinzas (%)
Clara de ovo em pó	11,2	74,9	0,2	5,1
Hidrolisado de clara de ovo	4,6	87,0	0,2	5,5

A Tabela 3 mostra a solubilidade e o grau de hidrólise atingidos pelas proteínas da clara de ovo submetidas à tratamento enzimático.

Tabela 3 - SOLUBILIDADE E GRAU DE HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DA CLARA DE OVO SUBMETIDAS À HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM FUNÇÃO DO TEMPO

Tempo (min)	CSS (g/100 g)	GH (%)
0	4,20	0,00
5	4,66	0,01
10	5,12	1,23
20	6,11	2,55
25	6,49	3,06
30	6,87	3,56
40	8,24	5,39
60	8,85	6,21
90	9,01	6,42
120	9,01	6,42
150	9,08	6,51
180	9,31	6,82

Observa-se um aumento da solubilidade das proteínas, isto é evidenciado pelo aumento da concentração de sólidos solúveis ao longo do tempo até atingir-se um patamar onde a concentração se estabiliza.

A Figura 1 representa a solubilidade e o grau de hidrólise das proteínas da clara de ovo. Observa-se que 6,2% de GH é atingido em 60 minutos, aumentando para 6,8% após 180 minutos. A seguir atingiu-se um patamar onde a solubilidade se estabilizou. É possível determinar nas condições de trabalho qual o grau de hidrólise mais econômico.

PETERSEN (12) descreve que para uma dada protease, o grau de hidrólise é determinante sobre as propriedades como solubilidade, funcionalidade e sabor da proteína hidrolisada.

A mistura utilizada teve a finalidade de se preparar um "pool" de enzimas com diferentes especificidades, visando a se conseguir maior taxa de conversão das proteínas em produtos de menor peso molecular.

POWRIE (13) considera a clara de ovo como um sistema protéico constituído de fibras de ovomucina numa solução aquosa de numerosas proteínas globulares. Dentre estas, as frações ovomucina e ovomucoide possuem a característica de serem inibidoras da tripsina e quimotripsina.

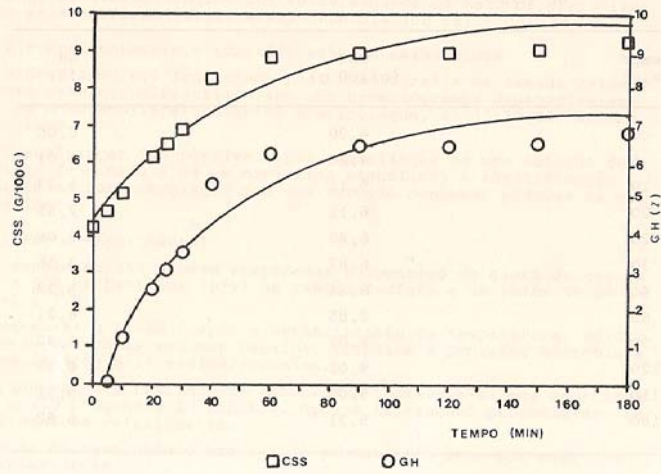


FIGURA 1 - CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS SOLÚVEIS E GRAU DE HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DE CLARA DE OVO TRATADAS COM PAPAÍNA, TRIPSINA E PROTEASE MICROBIANA

WHITAKER (16) cita que as frações ovomucoide, ovoinibidor e ainda a fração inibidora da papaína presentes na clara de ovo, são inibidores naturais de tripsina, quimotripsina, subtilisina, papaína e ficina respectivamente.

A Tabela 4 mostra os resultados da análise microbiológica da clara de ovo em pó e de seu hidrolisado. O produto apresenta qualidade microbiológica boa encontrando-se dentro das normas estabelecidas pela DINAL (4), para o ovo desidratado ou liofilizado.

Tabela 4 - CONTAGEM MICROBIOLÓGICA DA CLARA DE OVO E DE SEU HIDROLISADO

Determinação	Clara de ovo	Hidrolisado de clara de ovo
Contagem padrão (UFC/g)	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
Bolores e leveduras (UFC/g)	$1,0 \times 10^2$	< 30
Coliformes totais (NMP/g)	< 3,0	23
Coliformes fecais (NMP/g)	< 3,0	3,0
<u>Escherichia coli</u> (NMP/g)	3,0	3,0
<u>Staphylococcus aureus</u> (UFC/g)	< 100	< 100
<u>Salmonella</u>	ausente em 25g produto	ausente em 25g produto

A Tabela 5 apresenta os valores de Rf para os aminoácidos na sua forma livre presentes no filtrado. A observação dos cromatogramas permite identificar aminoácidos essenciais e não essenciais. Observa-se ainda a ocorrência do aumento na concentração de aminoácidos ao longo do tempo.

Tabela 5 - VALORES DE Rf PARA AMINOÁCIDOS, CELULOSE, N-BUTANOL: ACETONA:ÁCIDO ACÉTICO:ÁGUA, 35:35:10:20

Aminoácido	Rf
Leucina	8,96
Fenilalanina	7,76
Tirosina	6,40
Alanina	5,44
Treonina	4,48
Glicina	3,76
Histidina	2,08
Cistina	1,20

Dos três propósitos citados no início pretende-se numa primeira fase realizar testes com o hidrolisado na preparação de dietas destinadas a pessoas que necessitam de tratamento ou se encontram em condições fisiológicas especiais.

4 CONCLUSÕES

- . O produto final apresentou boa estabilidade e livre de contaminação;
- . A análise de substâncias resultantes da hidrólise permitiu a identificação de aminoácidos na sua forma livre.

Abstract

A protein hydrolysate was produced on pilot plant scale from egg white using papain, trypsin and bacterial proteinase. The hydrolysis increased solubility of the egg white protein. The maximum rate of hydrolysis were observed after 180 minutes at 6.8% of GH. Free amino acids were observed from hydrolysis. The product shows good stability and was microbiologically safe.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington DC, 1976.
- 02 ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 11th ed. Washington DC, 1970 p. 858.
- 03 AWAZUHARA, H. & NAKAMURA, R. Comparison of the foaming properties between egg yolk and albumen. Lebensmittel - wissenschaft Und Technologie, Zurich, 19(2):180-83, 1986.
- 04 BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria 001 de 28 de fevereiro de 1987. Diário Oficial da União, Brasília, 1987.
- 05 GOSSET, L.P.; RIZUI, S.S.; BAKER, R.C. Quantitative analysis of gelation in egg protein systems. Food Technology, New York, 38(5):67,68,70,72-74,96, 1984.
- 06 GRUNDEN, L.P. The effect of proteolytic enzymes on functional and physical properties of egg albumen. Dissertation abstracts international, Ann Arbor, 37(1):145-146, 1977.
- 07 INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2 ed. São Paulo, v. 1.
- 08 KATO, Y.; WATANABE, K.; NAKAMURA, R.; SATO, Y. Effect of pre-heat treatment on tryptic hydrolysis of maillard-heated ovoalbumin. J.Agr.and Food Chem., Washington, 31(2):437-41, 1983.
- 09 KHABATAKE, B. & DOI, E. Heat induced transparent gel prepared from pepsin-treated ovoalbumin and egg white. Agr.and Biol.Chem., Tokyo, 49(8):2457-8, 1985.

- 10 KILARA, A. Enzyme - modified protein food ingredients. Process Biochemistry, London, 20(5):149-57, 1985.
- 11 PAIVA, A. & TAHIN, Q.S. Effect of pH on the proteolysis of ovalbumin by pepsin and dephosphorylated pepsin. Enzymologia: Acta Biocatalytica, Den Haag, 37(3):153-62, 1969.
- 12 PETERSEN, B.R. The impact of the enzymic hydrolysis process on recovery and use of proteins. In: BIRCH, G.G.; PARKER, K.J.; BLAKEBROUGHT, N. Enzymes and food processing. London, Applied Science Publishers, 1981. p. 149-75.
- 13 POWRIE, W.D. Chemistry of eggs and egg products. In: STADELMAN, W.J. & COTTERIL, O.J. Egg Science and Technology, Connecticut, AVI, 1973. p. 61-107.
- 14 REGENSTEIN, J.M.; GRUNDEN, L.P.; BAKER, R.C. Proteolytic enzymes and the functionality of chicken egg albumen. J.Food Science, Chicago, 43(1):279-80, 1978.
- 15 WHITAKER, J.R. The proteolytic enzymes. In: _____. Principles of enzymology for the food sciences. New York, Marcel Dekker, 1972. p. 511-42.
- 16 WHITAKER, J.R. Naturally occurring peptide and protein inhibitor of enzymes. In: KIRSCHMAN, J.C. Impact of toxicology on food processing. Connecticut, AVI, 1981. p. 57-104.