

AMINOÁCIDOS DE HIDROLISADOS DE PROTEÍNA DE SOJA DOSAGEM DE ÁCIDO GLUTÂMICO (1)

DETECTION OF AMINOACIDS IN PROTEIN HYDROLYSATES OF SOYBEAN DETERMINATION OF GLUTAMIC ACID

MARIA ELISA WOHLERS DE ALMEIDA(2)
ANTONIA MATTOS SIMÃO(2)

SUMMARY

ALMEIDA, M.E.W. & SIMÃO, A.M. — Detection of aminoacids in protein hydrolysates of soybean. Determination of glutamic acid. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32:105-112, 1972.

Bidimensional paper chromatography was applied in order to separate the different aminoacids of industrial soybean protein hydrolysates, with satisfactory results.

Some modification were introduced into the classical methods for aminoacid detection and into the evaluation of glutamic acid.

The spots corresponding to the glutamic acid (standard and sample) had been cut out, eluted, and its contents of glutamic acid were determined by means of spectrophotometry.

INTRODUÇÃO

O emprego da soja e de produtos dela derivados vem sendo cada vez mais difundido na alimentação humana, com a finalidade de substituir a proteína de origem animal ou de complementar uma deficiência protéica.

Nos países asiáticos, os produtos de soja são largamente empregados no preparo de inúmeros alimentos, aos quais transmitem um típico *flavor*, como também fornecem, em extensão considerável, os aminoácidos necessários à dieta normal.

Sob o ponto de vista da nutrição, a proteína de soja tem um alto valor biológico e, neste aspecto, assemelha-se mais à proteína animal do que qualquer outra vegetal⁷.

A literatura sobre o valor nutritivo da proteína de soja tem sido revista de maneira exaustiva por vários autores, podendo-se citar entre eles o excelente resumo de CIRCLE & JOHNSON³.

Estudos mais recentes realizados por ALTHOFF², em seres humanos, indicam que a proteína de soja é uma proteína completa e pode substituir a animal na dieta humana, necessitando, apenas, de um pequeno suplemento de metionina e lisina.

A farinha de soja é empregada no preparo de numerosos produtos alimentícios, tais como: pães, bolos, biscoitos, bolachas, farinhas lácteas, produtos dietéticos, molhos e outros. A tendência atual da indústria, entretanto, é a de introduzir, além da farinha de soja, hidrolisados de proteína de soja não só para o enriquecimento protéico de produtos alimentícios, como também por outras qualidades intrínsecas como ação espessante, sabor característico e pela sua maior assimilação.

Com a finalidade de avaliar a qualidade protéica de hidrolisados de proteína de soja existentes no comércio, analisamos várias amostras detectando os aminoácidos e dosando o ácido glutâmico presente.

(1) Realizado no Serviço de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 9 amostras de hidrolisados de proteína de soja; todos os produtos, enviados para análise ao Instituto Adolfo Lutz, foram preparados nas respectivas indústrias, por hidrólise ácida, a partir de farinha de soja desengordurada.

Identificamos os aminoácidos por cromatografia em papel e a dosagem do ácido glutâmico foi feita por espectrofotometria.

O método usado foi baseado em várias técnicas já publicadas^{1, 6, 10, 11}. Entretanto, foi introduzido um novo artifício para a identificação dos aminoácidos e foram estipuladas novas condições de trabalho; montamos, assim, um método, qualitativo e quantitativo que, embora trabalhoso, mostrou-se adequado às necessidades do momento.

1. Equipamento

Papel Whatmann nº 1 (20 x 20 cm)
Cuba cromatográfica de Thomas
Micro-seringas
Espectrofotômetro Coleman Junior

2. Solventes

1ª fase ou 1º solvente

n-butanol-ácido acético glacial-água
(4:1:5)

Coloque o butanol, o ácido e a água em um funil de separação, agite, decante e utilize a fase superior.

2ª fase ou 2º solvente

Fenol-NH₄OH 3% (4:1)

3. Revelador

Solução de ninhidrina 0,2% em n-butanol saturado de água.

4. Preparo da amostra

Pese 100 mg de amostra, dissolva e dilua com água a 10 ml (se houver dificuldade na dissolução, adicione algumas gotas de HCl).

Transfira 1 ml da solução para um outro balão volumétrico de 10 ml e complete o volume com álcool isopropílico a 10%. Com esta solução são preparados os cromatogramas.

5. Padrões dos aminoácidos

Prepare de maneira idêntica à da amostra e nas mesmas condições.

6. Desenvolvimento do cromatograma

Foram colocados sobre o papel 20 μ l da solução da amostra e 10 μ l da solução padrão, de acordo com a fig. 1:

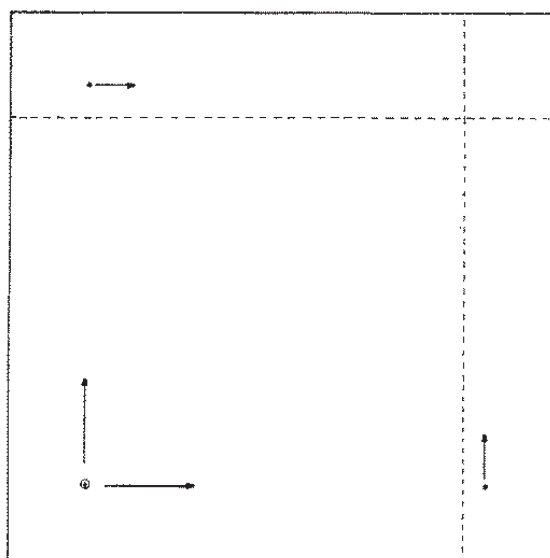


Fig. 1. – Esquema de aplicação da amostra e do padrão

- ⊙ Amostra
- Padrão
- Limite superior a que o solvente deve alcançar

Assim procedendo, os aminoácidos foram identificados pela posição indicada pelo padrão no próprio cromatograma e não pelos R_f ou pela posição relativa das manchas, como se faz usualmente.

Foram observadas as seguintes condições:
a) O fenol não deve apresentar alteração de cor.

b) Após o desenvolvimento do cromatograma com a 1ª fase, o papel é secado em estufa a 40°C e, logo em seguida, desenvolvido com a 2ª fase (não deixe para correr o cromatograma com o solvente fenol no dia seguinte).

c) Após o desenvolvimento com a 2ª fase, o cromatograma pode ser revelado no dia seguinte, mas deve ser guardado ao abrigo da luz. Antes de revelar, se necessário, seque o cromatograma a 40°C.

d) Revele o cromatograma com a solução de ninhidrina, seque em estufa a 40°C durante 2 horas, sendo os aminoácidos identificados no cromatograma de acordo com a posição indicada pelo ponto de intersecção de linhas ortogonais partindo das manchas correspondentes aos padrões (fig. 2 a 10).

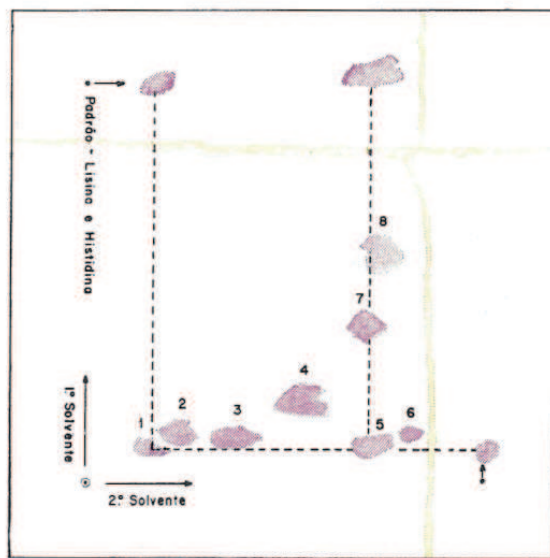


Fig. 3 — Identificação da histidina

- | | |
|--------------------|------------------------------|
| 1. Histidina | 5. Lisina |
| 2. Ácido glutâmico | 6. Arginina |
| 3. Treonina | 7. Triptofano |
| 4. Alanina | 8. Leucina e isoleucina |
| ⊙ Amostra | ● Padrão: Histidina e lisina |

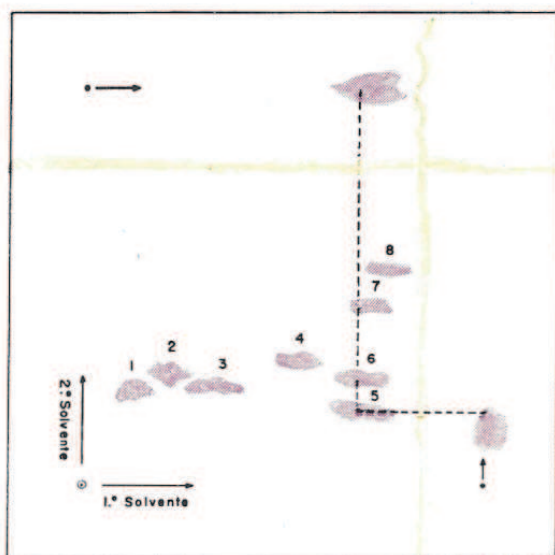


Fig. 2 — Identificação da lisina

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| 1. Histidina | 5. Lisina |
| 2. Ácido glutâmico | 6. Arginina |
| 3. Treonina | 7. Triptofano |
| 4. Alanina | 8. Leucina e isoleucina |
| ⊙ Amostra | ● Padrão: Lisina |

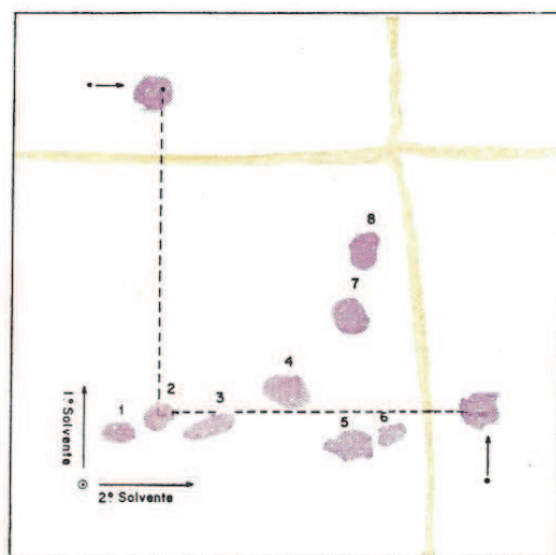


Fig. 4 — Identificação do ácido glutâmico

- | | |
|--------------------|---------------------------|
| 1. Histidina | 5. Lisina |
| 2. Ácido glutâmico | 6. Arginina |
| 3. Treonina | 7. Triptofano |
| 4. Alanina | 8. Leucina e isoleucina |
| ⊙ Amostra | ● Padrão: Ácido glutâmico |

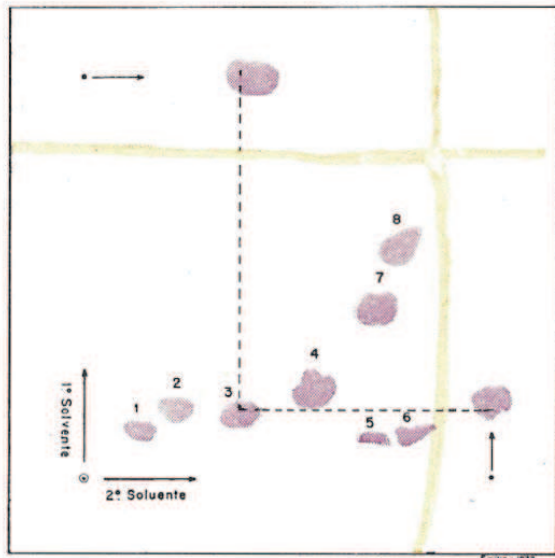


Fig. 5 – Identificação da treonina

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| 1. Histidina | 5. Lisina |
| 2. Ácido glutâmico | 6. Arginina |
| 3. Treonina | 7. Triptofano |
| 4. Alanina | 8. Leucina e isoleucina |
- ⊙ Amostra ● Padrão: Treonina

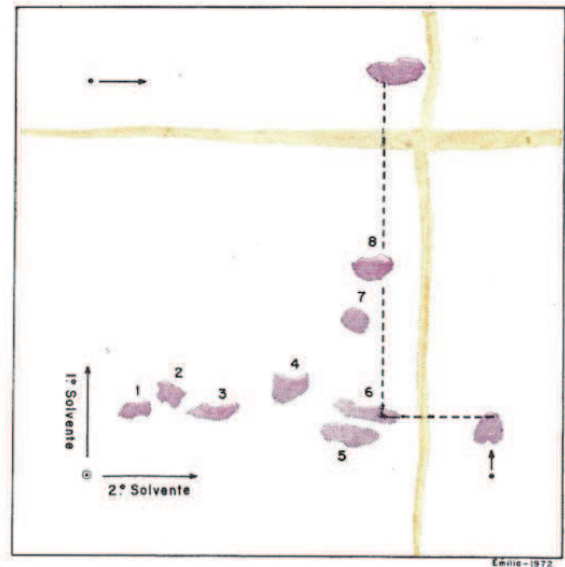


Fig. 7 – Identificação da arginina

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| 1. Histidina | 5. Lisina |
| 2. Ácido glutâmico | 6. Arginina |
| 3. Treonina | 7. Triptofano |
| 4. Alanina | 8. Leucina e isoleucina |
- ⊙ Amostra ● Padrão: Arginina

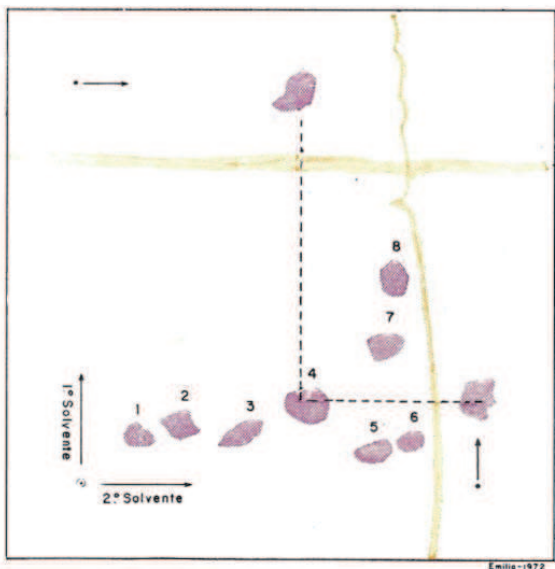


Fig. 6 – Identificação da alanina

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| 1. Histidina | 5. Lisina |
| 2. Ácido glutâmico | 6. Arginina |
| 3. Treonina | 7. Triptofano |
| 4. Alanina | 8. Leucina e isoleucina |
- ⊙ Amostra ● Padrão: Alanina

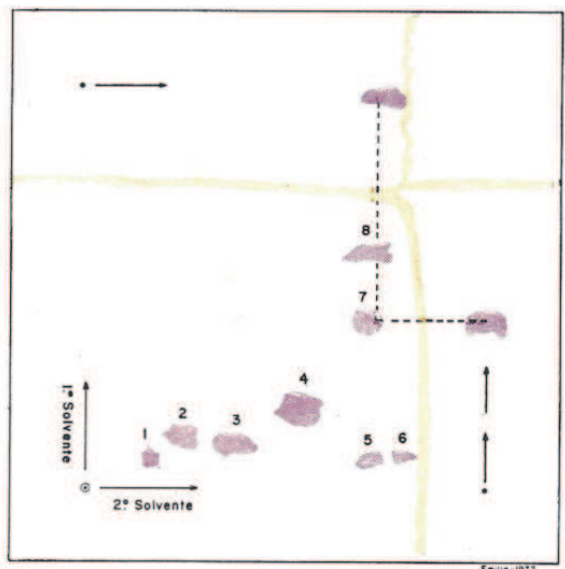


Fig. 8 – Identificação do triptofano

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| 1. Histidina | 5. Lisina |
| 2. Ácido glutâmico | 6. Arginina |
| 3. Treonina | 7. Triptofano |
| 4. Alanina | 8. Leucina e isoleucina |
- ⊙ Amostra ● Padrão: Triptofano

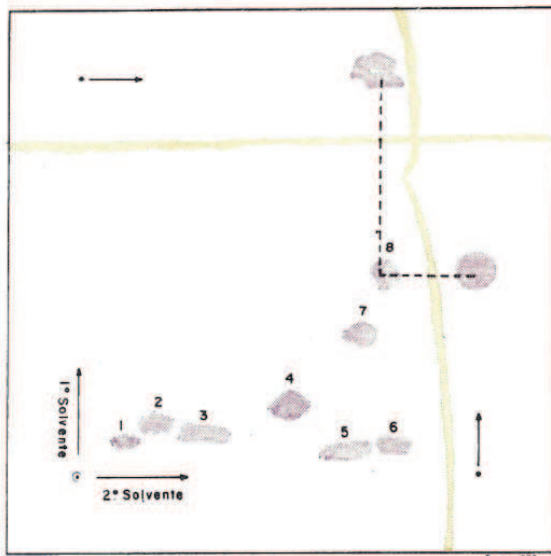


Fig. 9 – Identificação da leucina

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| 1. Histidina | 5. Lisina |
| 2. Ácido glutâmico | 6. Arginina |
| 3. Treonina | 7. Triptofano |
| 4. Alanina | 8. Leucina e isoleucina |
| ⊙ Amostra | ● Padrão: Leucina |

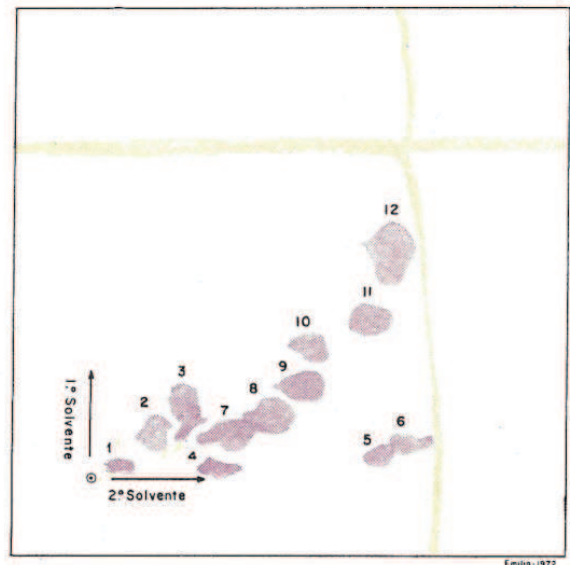


Fig. 11 – Aminoácidos de hidrolisados de cabelo humano (amostra a)

⊙ Amostra

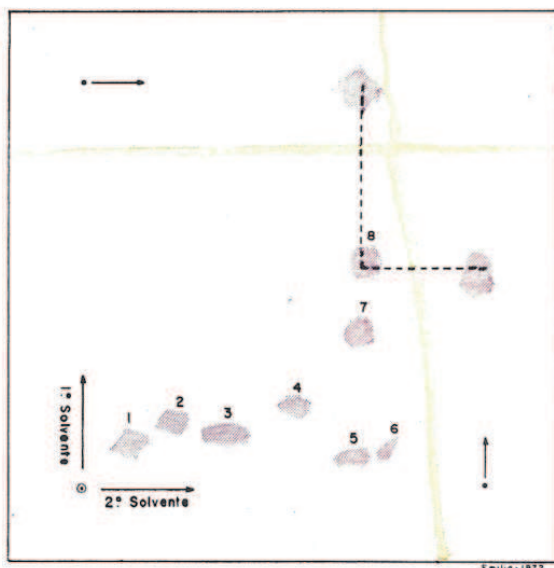


Fig. 10 – Identificação da leucina e isoleucina

- | | |
|--------------------|--------------------------------|
| 1. Histidina | 5. Lisina |
| 2. Ácido glutâmico | 6. Arginina |
| 3. Treonina | 7. Triptofano |
| 4. Alanina | 8. Leucina e isoleucina |
| ⊙ Amostra | ● Padrão: Leucina e isoleucina |

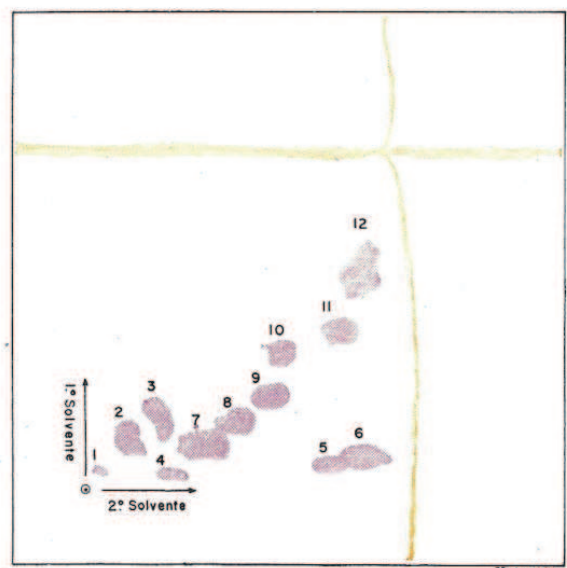


Fig. 12 – Aminoácidos de hidrolisados de cabelo humano (amostra b)

⊙ Amostra

7. Dosagem do ácido glutâmico

Logo após a identificação do ácido glutâmico, as manchas correspondentes ao padrão e ao ácido são recortadas, observando-se as mesmas áreas do papel de filtro; o mesmo foi feito com um branco retirado de um ponto do papel do próprio cromatograma.

Para facilitar a extração, as áreas retiradas são repicadas, colocadas dentro do tubo do aparelho de Colleman e tratadas com a seguinte solução:

Solução de $\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ (Solução estoque) 20 mg/100ml

No momento de usar, transfira 25 ml da solução estoque para um balão volumétrico de 100 ml e complete o volume com álcool absoluto.

Adicione ao tubo 4 ml da solução acima, agite durante 30 minutos após os quais os pedaços de papel, descorados, são retirados.

Para leituras espectrofotométricas convenientes, eluímos as manchas de três cromatogramas, correspondentes portanto a 60 μg da amostra e a 30 μg do padrão (procedemos de tal maneira porque não dispúnhamos de cubas cromatográficas maiores; a condição ideal seria colocar toda a amostra de uma só vez). O resultado final é a média de 3 leituras correspondendo a um total de 9 cromatogramas. As leituras são efetuadas no comprimento de onda de 570 $\text{m}\mu$.

As leituras em transmitância foram transformada em absorbância e o cálculo feito por meio da leitura do padrão.

RESULTADOS

Em todas as amostras analisadas foram identificados os seguintes aminoácidos: ácido glutâmico, alanina, lisina, histidina, triptofano, arginina, treonina e leucinas (fig. 2 a 10 e quadro I). Apenas em um produto composto contendo pequena quantidade de hidrolisado

de proteína de soja não foi detectada a presença de treonina. O teor de ácido glutâmico determinado em 5 amostras encontra-se reunido no quadro IV.

DISCUSSÃO

Naturalmente o processo empregado tem possibilidades limitadas, pois não identifica outros aminoácidos existentes na soja. Entretanto, como os hidrolisados não foram por nós preparados, mas sim manufaturados pelas indústrias, não sabemos até que ponto a hidrólise foi atingida ou se alguns dos aminoácidos existentes foram destruídos pelas condições do processo.

Na literatura consultada, comparando os nossos resultados com os encontrados por MIERZEJEWSKI & SKULMOWSKI⁹, que também pesquisaram aminoácidos em hidrolisados de proteína de soja por cromatografia em papel, observamos que os autores trabalharam com 3 pares de solventes. Com o 1º par (fenol-água 1:1 e piridina-butanol-água 25:45:40) identificaram serina, glicina, tirosina, alanina, arginina e triptofano; com o 2º par (butanol terciário-metiletilcetona-água 4:4:2 e butanol-metanol-água 4:5:1) identificaram alanina, triptofano, metionina, tirosina, valina, leucina e isoleucina; com um 3º par de solventes (fenol-água 7:3 e propanol-água 7:3) separaram e identificaram ácido aspártico, ácido glutâmico, histidina, treonina, prolina e alguns dos previamente citados, mas não separaram valina, metionina, leucina e isoleucina.

Verificamos assim que o par de solventes por nós empregado separa satisfatoriamente os aminoácidos existentes no hidrolisado de soja, embora tenha sensibilidade limitada, pois não conseguimos detectar metionina que é, segundo alguns autores, o aminoácido limitante da soja.

Entretanto, usando o mesmo par de solventes, trabalhando com 2 amostras de cabelo humano, cujo hidrolisado foi por nós preparado, conseguimos reproduzir 2 cromatogramas semelhantes, separando 12 aminoácidos (fig. 11 e 12).

QUADRO I

Aminoácidos de hidrolisados de proteína de soja

Ácido glutâmico	Leucinas
Alanina	Lisina
Arginina	Treonina
Histidina	Triptofano

Obtenção: hidrólise ácida

Identificação: cromatografia em papel

QUADRO II

*Aminoácidos de tortas de soja
(KUIKEN & LYMAN⁸)*

Ácido glutâmico	Lisina
Arginina	Metionina
Fenilalanina	Treonina
Histidina	Triptofano
Leucinas	Valina

Obtenção: hidrólise ácida

Identificação: método microbiológico

QUADRO III

*Aminoácidos de molho de soja
(TSUNODA et alii¹²)*

Ácido aspártico	Lisina
Ácido glutâmico	Metionina
Arginina	Prolina
Cistina	Serina
Fenilalanina	Tirosina
Glicina	Treonina
Histidina	Triptofano
Leucinas	Valina

Obtenção: hidrólise enzimática

Identificação: método microbiológico

QUADRO IV

*Teor de ácido glutâmico em hidrolisados
de proteínas de soja comerciais*

Amostra	Ácido glutâmico %	
	Declarado	Encontrado
a	5,5	6,2
b	7,1	8,3
c	7,5	8,2
d	17,8	16,5
e	4,3	4,4

Ainda na bibliografia consultada, no trabalho de KUIKEN & LYMAN⁸ encontramos os seguintes aminoácidos na composição da proteína de 20 variedades de soja (quadro II), obtida por hidrólise ácida e alcalina, determinados, porém, por métodos microbiológicos. Para molho de soja, obtido por hidrólise enzimática, no trabalho de TSUNODA et alii¹² foram encontrados e determinados por processo microbiológico 17 aminoácidos (quadro III).

A dosagem do ácido glutâmico foi efetuada nesses produtos comerciais com a finalidade de ser controlada a quantidade de monoglutamato de sódio neles declarados. Os melhores resultados para as leituras no espectrofotômetro foram obtidos usando-se a solução de sulfato de cobre em álcool em vez de eluir simplesmente com acetona ou álcool a 50% as manchas reveladas com ninhidrina.

O emprego de glutamato monossódico, como condimento em alimentos, foi estudado pelo COMITÊ MISTO FAO/OMS DE EXPERIMENTOS EN ADITIVOS ALIMENTARIOS^{4,5}, na sua 13ª reunião, que discutiu o problema de sua avaliação como aditivo alimentar e chegou à conclusão de que poderia ser dada ao glutamato monossódico uma ingestão diária aceitável (IDA) de 120mg/kg para indivíduos em geral, exceção feita a crianças menores de um ano. Com a finalidade de verificar se está sendo ou não ultrapassada a ingestão diária aceitável, seria de interesse efetuar sempre a dosagem do glutamato monossódico em alimentos.

CONCLUSÃO

Nas condições em que trabalhamos, com o par de solventes utilizado conseguimos separar um número razoável de aminoácidos de hidrolisado de proteína de soja, comparando com os dados da literatura consultada.

O presente método, dentro de determinados limites, aplica-se a diferentes hidrolisados de proteínas.

Com relação ao ácido glutâmico, a separação foi bastante satisfatória em todos os cromatogramas; quanto ao seu doseamento, obtivemos valores que satisfizeram as nossas necessidades imediatas.

RESUMO

ALMEIDA, M.E.W. & SIMÃO, A.M. — Aminoácidos de hidrolisados de proteína de soja. Dosagem de ácido glutâmico. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 105-112, 1972.

Cromatografia bi-dimensional em papel foi aplicada com a finalidade de separar os diferentes aminoácidos de hidrolisado de proteína de soja.

Foi introduzido, com resultados satisfatórios, um novo artifício para identificação dos aminoácidos, e foram feitas algumas modificações na determinação do ácido glutâmico. As manchas correspondentes ao ácido glutâmico (padrão e amostra) foram recortadas, eluídas e o ácido glutâmico foi determinado por espectrofotometria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, M.E.W. — Aminoácidos livres em camarões. Variações decorridas durante a decomposição. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 15: 158-167, 1955.
2. ALTHOFF, J.D. — Nitrogen balance in a nutritional test with TVP (textured vegetable proteins). *Med. Klin.*, 65: 1204-07, 1970.
3. CIRCLE, S.J. & JOHNSON, D.W. — Edible isolated soybean protein. In: ALTSCHUL, A.M., ed. *Processed plant protein foodstuffs*. New York, Academic Press, 1958. p. 399.-418.
4. COMITÉ MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN ADITIVOS ALIMENTARIOS. Ginebra, 1970. *Evaluación de los aditivos alimentarios*, 14º informe. Ginebra, 1971. (Org. Mund. Salud, Ser. Inf. Tecn., 462).
5. Ibid. 15º informe. Ginebra, 1972 (Org. Mund. Salud, Ser. Inf. Tecn. 488).
6. FOWDEN, L. — The quantitative recovery and colorimetric estimation of aminoacids separated by paper chromatography. *Biochem. J.*, 48: 327-333, 1951.
7. KENT-JONES, D.W. & AMOS, A.J. — Modern cereal chemistry. 4.ed., 2.impr. Liverpool, Northern Publishing, 1950. p. 110.
8. KUIKEN, K.A. & LYMAN, C.M. — Essential aminoacids composition of soybean meals prepared from twenty strains of soybeans. *J. Biol. Chem.*, 177: 29-36, 1949.
9. MIERZEJEWSKI, T. & SKULMOWSKI, J. — Detection and separation of aminoacids in protein hydrolyzates of soybeans by the paper chromatography method. *Annls Univ. Mariae Curie-Skolodowska* (Polonia), Sect. DD, 6: 309-324, 1951 apud *Chem. Abstr.*, 47: 7948d, 1953.
10. POLSON, A.; MOSLEY, V.M. & WYCKOFF, R.W.G. — The quantitative chromatography of silk hydrolysate. *Science*, 105: 603-604, 1947.
11. THOMPSON, J.F. & MORRIS, J.E. — Determination of aminoacids from plants by paper chromatography. *Analyt. Chem.*, 31: 103-139, 1959.
12. TSUNODA, T.; ISHIZUKA, Z.; MIYAZAWA, S. & TAMURA, G. — The microbiological determination of aminoacids in soy sauce. *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, 26: 477-480, 1952 apud *Chem. Abstr.*, 48: 14109e, 1954.

Recebido para publicação em 17 de agosto de 1972.