

AÇÃO DA PROTEASE DO *Aspergillus sojae* E DA PANCREATINA NA HIDRÓLISE DO CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE

Marialice Pinto Coelho Silvestre*^{1,2}, Harriman Aley Morais^{1,3}, Mauro Ramalho Silva², Viviane Dias Medeiros Silva², Mariana Wanessa Santana de Souza².

¹ Universidade Federal de Minas Gerais - Faculdade de Medicina

² EDETEC Indústria Alimentícia S/A

³ Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

Resumo: A obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico de soro de leite, com elevado teor de di- e tripeptídeos e aminoácidos livres, assim como quantidade reduzida de grandes peptídeos, consistiu no objetivo do presente trabalho. Para tal, foram avaliadas as ações de uma protease do *Aspergillus sojae* e de uma pancreatina suína, em seis valores de relações enzima:substrato, no pH 7,0, a 50 °C, por 5 h. A cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular e o método da Área Corrigida da Fração foram utilizados para o fracionamento e quantificação dos peptídeos e aminoácidos livres presentes nos hidrolisados. Observou-se que o tipo de enzima e a relação enzima:substrato apresentaram efeito significativo sobre o perfil peptídico dos hidrolisados. Os cromatogramas obtidos pela ação das duas enzimas foram diferentes e variaram de acordo com a especificidade ou a atividade enzimática. O melhor resultado encontrado foi para o hidrolisado obtido quando a pancreatina atuou a uma relação enzima: substrato de 8:100, tendo apresentado um dos menores teores de grandes peptídeos (41,13%), e os maiores de di- e tripeptídeos (6,46%) assim como de aminoácidos livres (8,22%).

Palavras-chave: Hidrolisado Proteico; Enzimas; Relação Enzima:substrato; Peptídeos.

Action of protease from *Aspergillus sojae* and pancreatin in the hydrolysis of whey protein concentrate: The preparation of hydrolysates from whey protein concentrate with high contents of di- and tripeptides and free amino acids, and reduced amount of large peptides, was the objective of this study. The actions of a protease from *Aspergillus sojae* and a pancreatin at six enzyme:substrate ratios, pH 7.0, at 50 °C for 5 h were evaluated. The size-exclusion-high performance liquid chromatography and the method of the Correct Fraction Area were used for the fractionation and quantification of peptides and free amino acids in the hydrolysates. It was observed that the type of enzyme and the enzyme: substrate ratio affected significantly the peptide profile of the hydrolysates. The chromatograms obtained by the action of two enzymes were different and varied according to the specificity or enzymatic activity. The best peptide profile was found for the hydrolysate obtained using pancreatin at an enzyme: substrate ratio of 8:100 that showed the smallest amount of large peptides (41.13%), and the greatest di- and tripeptide (6.46%) and free amino acid (8.22%) contents.

Keywords: Protein Hydrolysate, Enzymes, Enzyme:substrate Ratio, Peptides.

1 Introdução

A transformação do soro de leite de um poluente, co-produto da fabricação de queijo, em uma excelente fonte de nutrientes ocorreu ao longo dos últimos 50 anos, aproximadamente. Componentes do soro, principalmente as proteínas e peptídeos, estão sendo

cada vez mais preferidos como ingredientes para alimentos funcionais, mudança esta que vem sendo construída baseada na tendência do consumidor em valorizar a saúde e o bem-estar, além da descoberta contínua e comprovação da funcionalidade biológica de constituintes do soro de leite (SMITHERS, 2008).

No intuito de promover uma maior utilização do soro de leite, cujas características perecíveis e a alta diluição de seus componentes apresentam certos inconvenientes, tecnologias de separação por membranas vêm sendo desenvolvidas e aplicadas ao

* E-mail: malice@ufmg.br

processamento de soro de leite, dando origem a alguns produtos, tais como o concentrado proteico (*whey protein concentrate* - WPC) (BRANS *et al.*, 2004).

As propriedades funcionais, nutricionais e imunológicas de proteínas podem ser melhoradas por meio da hidrólise enzimática. Portanto, hidrolisados proteicos vêm sendo amplamente preparados e utilizados como ingredientes alimentares em bebidas energéticas, alimentos para idosos, dietas hipoalergênicas, fórmulas enterais para crianças e adultos doentes, etc. Várias fontes de proteínas são normalmente utilizadas para este fim, desde as vegetais, tais como a soja até as proteínas de origem animal, tais como proteínas de carne, de ovo, ou peixe. O interesse na obtenção de hidrolisados enzimáticos de proteínas do soro de leite está associado ao seu alto valor nutritivo, baixo amargor e baixa antigenicidade (GUADIX; CAMACHO; GUADIX, 2006).

São inúmeras as enzimas que podem ser utilizadas na hidrólise de proteínas e, neste trabalho, uma protease do *Aspergillus sojae* e uma pancreatina foram testadas. A primeira refere-se a uma exopeptidase capaz de liberar aminoácidos N-terminais (NC-IUBMB, 2010) enquanto que a pancreatina constitui-se de um preparado enzimático contendo endo- e exopeptidases (NC-IUBMB, 2010; WHITAKER; HAARD; SHOEMAKER, 2003), sendo capaz de romper a molécula proteica em pontos diversos.

O valor nutricional dos hidrolisados proteicos, entre outros aspectos, está relacionado com o tamanho dos peptídeos, visto que o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção dos mesmos e, além disso, fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente pelo organismo do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou a proteína intacta (BOZA *et al.*, 2000; GANAPATHY; GUPTA; MARTINDALE, 2006). Portanto, a caracterização do perfil peptídico de hidrolisados proteicos, quanto à distribuição de acordo com o tamanho da cadeia, representa uma tarefa importante quando o interesse está voltado para a sua utilização dietética.

Um método eficiente foi desenvolvido pela equipe do presente trabalho, visando o fracionamento e a quantificação dos peptídeos, empregando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli (2-hidroxietil-aspartamido)-sílica (PHEA), que possibilitou separar peptídeos com massas moleculares menores do que 1.000 Da, sendo este método empregado no presente trabalho (SILVESTRE; HAMON; YVON, 1994a,b). Este método já foi utilizado, pelo mesmo grupo de pesquisa, na caracterização do perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos obtidos de diversas fontes proteicas (MORATO *et al.*, 2000; CARREIRA *et al.*, 2004; LOPES; DELVIVO; SILVESTRE, 2005; MORAIS *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2007; LOPES *et al.*, 2008).

Este trabalho teve como objetivo a otimização da hidrólise enzimática do WPC visando a obtenção de

elevado teor de di- e tripeptídeos e de aminoácidos livres, assim como quantidade reduzida de grandes peptídeos, avaliando-se o efeito do tipo de enzima e da relação E:S.

2 Material e Métodos

2.1 Material

O concentrado proteico de soro de leite (WPC - *Whey Protein Concentrate*) na forma de pó (Kerrylac 750) foi doado pela Kerry do Brasil Ltda. (Três Corações, MG, Brasil). A pancreatina suína (Corolase PP®, atividade 5,97 U/mL) e a protease de *Aspergillus sojae* (Corolase LAP®, atividade 0,63 U/mL) foram gentilmente cedidas pela AB Enzymes (Barueri, SP, Brasil). Neste trabalho, uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µg de tirosina, em um minuto, a 37 °C.

O ácido fórmico foi adquirido da Merck (Whitehouse Station, NJ, EUA). As membranas de fluoreto de polivinildieno para filtração das amostras (0,22 µm) e dos solventes (0,45 µm), assim como o sistema de fluxo tangencial com porosidade de corte para peso molecular de 10 kDa foram adquiridos da Millipore (São Paulo, SP, Brasil). Todos os demais reagentes empregados neste trabalho eram de grau analítico.

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usado no fracionamento dos hidrolisados proteicos era constituído por coluna cromatográfica PHEA [poli-(2-hidroxietil-aspartamida)-sílica], 250 x 9,4 mm, 5 µm e 200 Å (PolyLC, Columbia, MD, EUA), bomba isocrática e detector espectrofotométrico UV-VIS (série 1200, Agilent, Santa Clara, CA, EUA), acoplado a um computador com software Chem Station for LC Systems (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). A água utilizada no preparo da fase móvel foi purificada em sistema MilliQ (Millipore, Billerica, MA, EUA).

2.2 Métodos

2.2.1 Preparo dos hidrolisados enzimáticos de WPC

Foram preparados doze hidrolisados enzimáticos, empregando-se a pancreatina e a protease de *Aspergillus sojae*, com relações E:S (g de enzima/g de proteína) de 0,5:100, 1:100, 2:100, 3:100, 4:100 e 8:100. As condições empregadas no preparo destes hidrolisados estão apresentadas na Tabela 1, sendo que os valores de pH e temperatura correspondem aos ótimos fornecidos pelo fabricante das enzimas.

As soluções a 10 g% de concentrado proteico de soro de leite foram preparadas em água destilada, correspondendo a 3,42% (p/v) de proteína, sendo o pH ajustado para 7,0, com solução de NaOH a 3 mol/L.

Posteriormente, foram aquecidas até se atingir 50 °C, em banho de vaselina, sob agitação constante em agitador magnético (modelo 752A, Fisatom, São Paulo, SP, Brasil), seguida da adição das enzimas em quantidade adequada para se obter a relação E:S desejada. O tempo total de hidrólise foi de 5 horas e, após este período, as enzimas foram inativadas por aquecimento em banho-maria a 75 °C, por 15 segundos. As amostras foram liofilizadas (Freeze Dry System/FreeZone 4,5, model 77500, Labconco, Kansas City, EUA) e armazenadas em freezer até o momento do uso.

2.2.2 Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite

A caracterização do perfil peptídico foi realizada em duas etapas: fracionamento dos peptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia, e sua posterior quantificação. O fracionamento dos peptídeos foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM) em coluna poli-(2-hidroxietil-aspartamida)-sílica (PHEA), conforme método desenvolvido por Silvestre, Hamon e Yvon (1994a). As amostras foram dissolvidas em concentração de 1 g% (p/v) na fase móvel (ácido fórmico a 0,05 mol/L, pH 2,5), filtradas por meio de membranas de 0,22 µm e submetidas à cromatografia à temperatura ambiente, sob condições isocráticas, em fluxo de 0,5 mL/min, durante 35 min. O volume de amostra injetado foi de 50 µL. A fase móvel foi filtrada através de membrana de 0,45 µm e desgaseificada em ultrassom (modelo USC1400, UNIQUE, Santo Amaro, Brasil), sob vácuo, por 30 min.

O método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF), desenvolvido por Silvestre, Hamon e Yvon (1994b), foi utilizado para quantificar os peptídeos e aminoácidos livres presentes nos hidrolisados do soro de leite, após a multidetecção das frações a 230 nm, 280 nm e 300 nm. Resumidamente, foram preparados cinco hidrolisados, considerados como padrão (dois com tripsina e três com pancreatina), os quais foram

fracionados por CLAE-EM em coluna PHEA. As frações obtidas foram coletadas (Coletor de frações, modelo CF-1, Spectrum Chrom, Houston, TX, EUA), sendo o solvente removido de cada fração em evaporador Centrivap (modelo 78100-00D, Labconco, Kansas City, MO, EUA). Posteriormente, as frações foram submetidas à análise de aminoácidos. O cálculo da ACF foi realizado por meio de fórmulas, após a multidetecção das frações a 230 nm, 280 nm e 300 nm, para se eliminar a interferência devida à absorção dos aminoácidos aromáticos. Traçou-se, então, uma curva plotando-se a ACF em função do teor de aminoácidos.

2.2.3 Avaliação do efeito de alguns parâmetros

O efeito do tipo de enzima e da relação enzima:substrato sobre o perfil peptídico dos hidrolisados enzimáticos do WPC foi avaliado neste trabalho considerando-se dois fatores: 1. a obtenção do melhor perfil peptídico, do ponto de vista nutricional; 2. a redução de custos do processo para adaptação em larga escala (uso da menor E:S).

2.2.4 Análise estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Para verificar a presença de efeitos significativos entre os diferentes tratamentos, foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema de análise fatorial (quatro enzimas x seis relações enzima:substrato), sendo os resultados analisados com o software *Statistica for Windows* (STATSOFT, Inc., 2000). A análise de variância foi empregada para determinar o efeito do tipo de enzima e da relação E:S nos teores de peptídeos e aminoácidos livres dos hidrolisados de WPC. As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias foram avaliadas pelo teste de Duncan (PIMENTEL-GOMES, 2000).

Tabela 1 - Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite

Hidrolisados	Tipo de enzima	E:S	pH	Temperatura
H1	Protease de <i>Aspergillus sojae</i>	0,5:100	7,0	50 °C
H2		1,0:100		
H3		2,0:100		
H4		3,0:100		
H5		4,0:100		
H6		8,0:100		
H7	Pancreatina	0,5:100	7,0	50 °C
H8		1,0:100		
H9		2,0:100		
H10		3,0:100		
H11		4,0:100		
H12		8,0:100		

NOTA: E:S = relação enzima:substrato.

3 Resultados e Discussão

3.1 Perfil peptídico dos hidrolisados proteicos

A técnica de CLAE-EM, utilizada no presente trabalho, permitiu a caracterização dos hidrolisados proteicos, especialmente com relação ao fracionamento de peptídeos de baixas massas moleculares, ou seja, inferiores a 1.000 Da. Assim, como mostrado na Figura 1, as amostras foram separadas em quatro frações, sendo F1 de 13,0 a 17,0 min (grandes peptídeos, com mais de 7 resíduos de aminoácidos); F2, de 17,0 a 20,5 min (peptídeos médios, entre 4 e 7 resíduos); F3, de 20,5 a 21,5 min (di- e tripeptídeos); e F4, de 21,5 a 32,0 min (aminoácidos livres). Este resultado confirma os de outros trabalhos da mesma equipe de pesquisa que empregaram técnica idêntica, visando o fracionamento de hidrolisados enzimáticos obtidos de diversas fontes proteicas, e em condições de hidrólise variadas. Dentre estes estudos, destacam-se os realizados com caseína (MORATO *et al.*, 2000; CARREIRA *et al.*, 2004; MORAIS *et al.*, 2005), arroz (LOPES *et al.*, 2008), leite desnatado (LOPES; DELVIVO; SILVESTRE, 2005; SOARES *et al.*, 2007), soro de leite (DELVIVO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2008), concentrado proteico de soro de leite (SILVA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010; SILVESTRE *et al.*, 2011) e farinha de trigo (CARREIRA *et al.*, 2011)

Ainda, pode ser observada na Figura 1, uma significativa variação do perfil peptídico dos hidrolisados proteicos, obtidos pela ação da protease de *Aspergillus sojae* e da pancreatina, associada à diferença de especificidade ou de atividade proteolítica das enzimas utilizadas. Considerando que a primeira enzima é uma exopeptidase, capaz de liberar aminoácidos N-terminais (NC-IUBMB, 2010), esperava-se que sua ação originasse um teor elevado de aminoácidos livres (Fração F4), fato este que não foi observado. Isto poderia ser explicado, provavelmente, pela baixa atividade proteolítica (0,63 U/mL) da enzima que resultou em uma hidrólise branda do WPC com formação de alto teor de grandes peptídeos,

confirmado pela área grande da fração F1. Por outro lado, o cromatograma obtido pela ação da pancreatina aproximou-se do esperado, uma vez que sendo um preparado enzimático contendo endo- e exopeptidases (NC-IUBMB, 2010; WHITAKER; HAARD; SHOEMAKER, 2003), esta enzima promoveu o rompimento da molécula proteica em pontos diversos, favorecendo a liberação de peptídeos menores, o que pode ser verificado pela menor área da fração F1 e maior das frações F2, F3 e F4, quando comparadas com as da protease de *Aspergillus sojae*.

Foram encontrados na literatura três trabalhos de outros autores com hidrolisados de WPC, onde foi relatada esta variação na distribuição de peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, em relação ao tipo de enzima empregado. Assim, Wróblewska *et al.* (2004) empregaram a papaína e a protease de *Bacillus licheniformis* na hidrólise do WPC (50 °C, pH 8,0, 120 min). Embora não tenham apresentado dados quantitativos, os autores afirmaram que o melhor perfil peptídico foi obtido pela ação da protease de *Bacillus licheniformis*, tendo em vista a menor área do pico relativo à proteína não hidrolisada (> 12.600 Da), bem como ao maior número de picos correspondendo a peptídeos de massa molecular inferior a 1.040 Da, observados no cromatograma obtido por CLAE-EM, quando comparado ao relativo à papaína.

O perfil peptídico determinado por eletroforese capilar de alta performance, também foi diferente ao se comparar a ação das enzimas pancreatina (Sigma, St Louis, MO, EUA) e das proteases de *Bacillus* sp. (Protamex™, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) e de *Bacillus licheniformis* (Alcalase 0,6L, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) (PACHECO; SGARBIERI, 2005). Embora os autores não tenham apresentado a distribuição da massa molecular dos peptídeos, eles afirmaram que os perfis cromatográficos dos hidrolisados obtidos pelas duas primeiras enzimas eram semelhantes, tendo em vista a similaridade dos tempos de retenção dos picos nos eletroforetogramas, os quais, por outro lado, eram distintos daqueles observados para a protease de *Bacillus licheniformis*. Segundo os pesquisadores, essas diferenças poderiam ser explicadas pelo uso de enzimas com distintas especificidades.

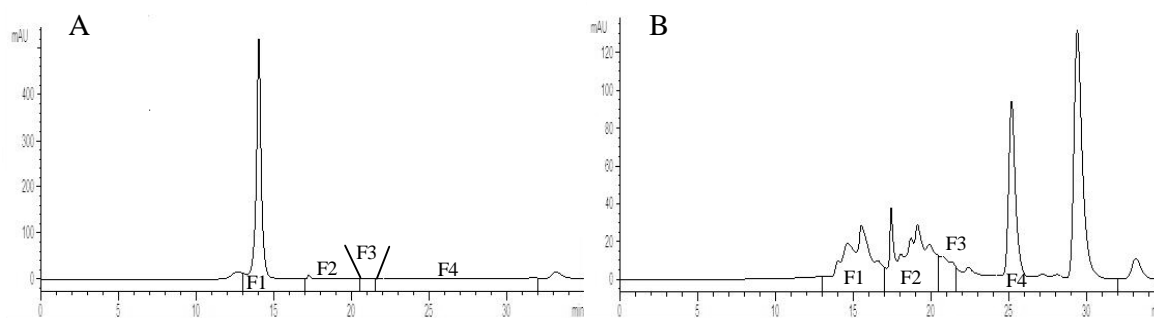


FIGURA 1 - Perfil cromatográfico dos hidrolisados enzimáticos de WPC. A e B: cromatogramas de hidrolisados obtidos com a protease de *Aspergillus sojae* (H6) e a pancreatina (H12), respectivamente. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: peptídeos médios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres.

Tabela 2 - Teores de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite

Hidrolisados	F1	F2	F3	F4	F3 + F4
H1	97.89 ^A	1.68 ^{FG}	0.25 ^F	0.18 ^F	0,43 ^G
H2	95.23 ^B	3.60 ^{DEF}	1.05 ^D	0.12 ^F	1,17 ^{FG}
H3	97.35 ^A	1.30 ^{FG}	0.35 ^{EF}	1.03 ^{EF}	1,38 ^F
H4	98.21 ^A	0.26 ^G	0.50 ^{EF}	1.03 ^{EF}	1,53 ^F
H5	94.39 ^B	3.51 ^{EF}	0.38 ^{EF}	1.73 ^E	2,11 ^F
H6	89.73 ^D	4.62 ^{DE}	0.83 ^{DE}	4.81 ^C	5,64 ^E
H7	92.38 ^C	5.85 ^D	0.34 ^{EF}	1.44 ^E	1,78 ^F
H8	66.72 ^E	27.46 ^C	2.45 ^C	3.37 ^D	5,82 ^E
H9	49.61 ^F	42.75 ^B	3.67 ^B	3.97 ^{CD}	7,64 ^D
H10	44.89 ^G	42.29 ^B	6.52 ^A	6.30 ^B	12,82 ^B
H11	40.90 ^H	49.12 ^A	3.78 ^B	6.20 ^B	9,98 ^C
H12	41.13 ^H	44.18 ^B	6.46 ^A	8.22 ^A	14,68 ^A

NOTA: Os resultados representam a média de triplicatas. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de significância, na mesma coluna. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos (2 e 3 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres.

Kim *et al.* (2007) empregaram a cromatografia líquida de fase reversa, utilizando a coluna Zorbax 300SB, para avaliar o perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos de WPC, obtidos pela ação da tripsina, papaína e das proteases de *Bacillus licheniformis* e de *Aspergillus oryzae*. Os autores afirmaram que a hidrólise mais extensa do WPC foi observada com a protease de *Bacillus licheniformis*, considerando-se o maior número de picos de curtos comprimentos de onda detectados nos cromatogramas dos hidrolisados obtidos com esta enzima, quando comparado aos da protease de *Aspergillus oryzae*, tripsina e papaína. Ainda, de acordo com os pesquisadores, a detecção destes picos corresponderia à hidrólise das proteínas do soro de leite a peptídeos de cadeia curta.

Na Tabela 2, pode-se verificar uma significativa variação dos teores de peptídeos e aminoácidos livres entre os diferentes hidrolisados enzimáticos do WPC. Para a escolha dos melhores hidrolisados, visando o desenvolvimento de suplementos alimentares para nutrição clínica, as ponderações de alguns autores devem ser consideradas. Assim, segundo Frenhani e Burini (1999), durante o metabolismo de proteínas, o primeiro estágio de hidrólise leva à formação de oligopeptídeos contendo de dois a seis resíduos de aminoácidos e aminoácidos livres. Estes peptídeos são, então, clivados em di- e tripeptídeos e, finalmente, as proteínas são absorvidas na forma de di- e tripeptídeos e de aminoácidos livres. Ainda, de acordo com estes mesmos autores os di- e tripeptídeos são mais eficientemente absorvidos que os aminoácidos livres, os quais, por sua vez, apresentam maior absorção que os tetra ou peptídeos superiores. Em quantidades equivalentes de di- e tripeptídeos e misturas de aminoácidos livres, os di- e tripeptídeos apresentam velocidade de absorção aproximadamente dez vezes maior. Outro estudo (GONZÁLEZ-TELLO *et al.*, 1994) também relatou as vantagens dos di- e

tripeptídeos sobre os aminoácidos livres por apresentarem maior velocidade de absorção.

Neste contexto, no presente trabalho, os critérios definidos para a escolha dos hidrolisados nutricionalmente mais vantajosos estão associados à presença de elevados teores de di- e tripeptídeos (fração F3) e de aminoácidos livres (fração F4), além de baixos conteúdos de grandes peptídeos (fração F1). Assim, concluiu-se que, do ponto de vista nutricional, pode-se destacar os perfis peptídicos de quatro hidrolisados. Dentre eles, o do hidrolisado H12 situa-se na primeira posição, tendo apresentado um dos menores teores de grandes peptídeos (41,13%), e os maiores de di- e tripeptídeos (6,46%) assim como de aminoácidos livres (8,22%). Seguem-se os hidrolisados H11 e H10, cujos perfis peptídicos são semelhantes entre si, do ponto de vista nutricional e, finalmente, o H9.

Um relato de outros autores foi encontrado na literatura abordando a quantificação de peptídeos de WPC após o seu fracionamento de acordo com o tamanho da cadeia. Spellman, O'Cuinn e Fitzgerald (2005) reportaram o efeito da ação de dois preparados enzimáticos de *Bacillus licheniformis* (Alcalase 2.4L e Prolvyte 1000) e da subtilisina sobre o perfil peptídico de hidrolisados de WPC, avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência de permeação em gel, utilizando a coluna TKS G2000 SW. Estes autores relataram que a ação da protease de *Bacillus licheniformis* (Alcalase 2.4L) foi mais vantajosa, tendo em vista que permitiu a obtenção de maior teor de peptídeos com massa inferior a 1 kDa (81%), quando comparado com os resultados da outra protease de *Bacillus licheniformis* (Prolvyte 1000) e a subtilisina, que foram de 62,6% e de 63,2%, respectivamente. Além disso, eles ainda verificaram que o hidrolisado da protease de *Bacillus licheniformis* (Alcalase 2.4L) continha apenas 3,2% de peptídeos com mais de 5 kDa, enquanto que para a outra protease

de *Bacillus licheniformis* (Prolyve 1000) e para a subtilisina, estes valores eram de 13,8% e 13,1%, respectivamente. De acordo com Spellman, O’Cuinn e Fitzgerald (2005), estes resultados podem ser justificados pelo fato de que Alcalase 2.4L foi o preparado que apresentou a maior atividade proteolítica (23,0 U/mg de enzima), seguida pela Prolyve 1000 (18,9 U/mg de enzima) e da subtilisina (15,2 U/mg de enzima).

O perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos do WPC foi, anteriormente, avaliado em três estudos da mesma equipe de pesquisa tendo sido utilizado enzimas diferentes das empregadas no presente trabalho. No primeiro, Silvestre *et al.* (2011) estudaram a ação da subtilisina, uma protease de *Bacillus subtilis* (Protymax N200, Prozyn, São Paulo, SP, Brasil), em diferentes condições de reação, tendo obtido um perfil peptídico bem superior ao do H12 do presente estudo, com

relação a maiores teores de di- e tripeptídeos (13,34%) e de aminoácidos livres (45,56%), além de menor quantidade de grandes peptídeos (12,28%).

No segundo, Silva *et al.* (2009) empregaram diversas enzimas para hidrolisar o WPC (subtilisina; proteases do *B. amyloquefaciens*, *A. oryzae* e *B. stearothersophilus*), sendo o melhor perfil peptídico obtido pela ação da protease de *Aspergillus oryzae*, o qual foi superior ao do H12 em termos de maiores quantidades de di- e tripeptídeos (16,14%) e aminoácidos livres (18,43%), além de menores teores de grandes peptídeos (18,76%).

No terceiro estudo, Silva *et al.* (2010), ao empregar uma papaína, encontraram o seguinte perfil peptídico: 25,73% de grandes peptídeos, 15,29% de di- e tripeptídeos e 47,83% de aminoácidos livres. Estes valores demonstram a superioridade sobre o perfil obtido para o H12 no presente trabalho.

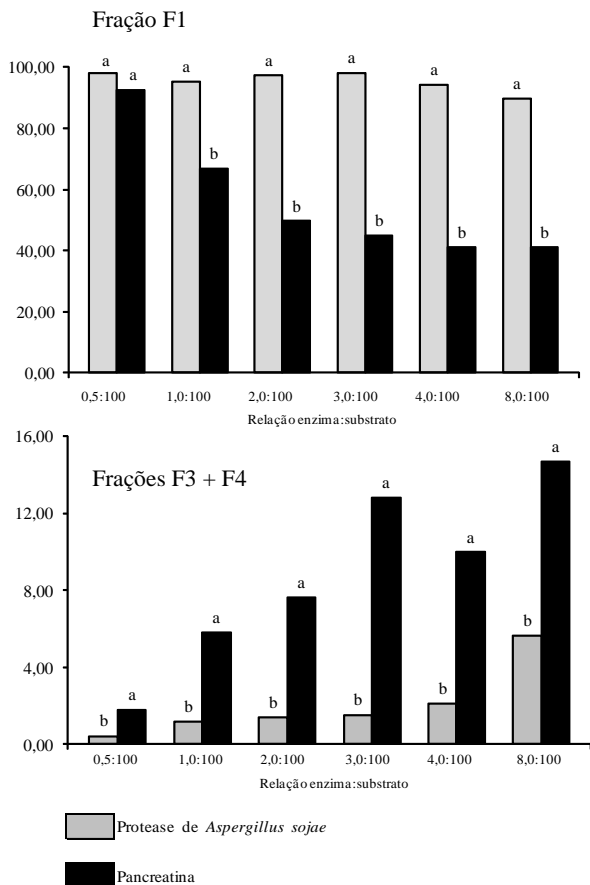


Figura 2 - Efeito do tipo de enzima sobre o perfil peptídico dos hidrolisados de WPC.

NOTA: Dentro de cada grupo, correspondendo a um valor de E:S, as barras representam os hidrolisados obtidos pela ação da protease de *Aspergillus sojae* e da pancreatina, respectivamente, observadas da esquerda para a direita. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F3 + F4: di- e tripeptídeos (2 e 3 resíduos de aminoácidos) + aminoácidos livres. Os resultados representam a média de triplicatas, que se indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de significância, no caso de uma mesma relação enzima:substrato para diferentes enzimas

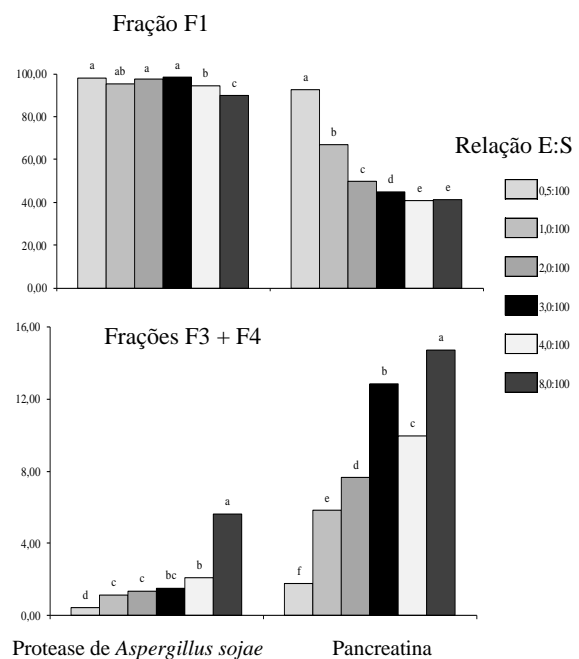


Figura 3 - Efeito da relação E:S sobre o perfil peptídico dos hidrolisados de WPC.

NOTA: F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F3+F4: di- e tripeptídeos (2 e 3 resíduos de aminoácidos) + aminoácidos livres. Os resultados representam a média de triplicatas, que se indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de significância, no caso de uma mesma enzima para diferentes relações E:S.

Entretanto, deve-se ressaltar que os resultados de Silva *et al.* (2010) somente foram alcançados após ter submetido este hidrolisado ao processo de ultrafiltração/diafiltração com membrana de porosidade de corte para peso molecular de 10 kDa, o que provavelmente reduziu o teor de substrato não hidrolisado e de grandes peptídeos, elevando, proporcionalmente, os teores de oligopeptídeos.

3.2 Efeito de alguns parâmetros sobre o perfil peptídico

Os resultados desta parte estão apresentados na forma de figuras, no intuito de facilitar a discussão dos mesmos, e optou-se por analisar além da F1, a somatória das frações F3 e F4. Na verdade, é o conjunto destas duas frações que representa a forma em que a proteína é mais eficientemente absorvida pelo organismo, tendo em vista a existência de sistemas de transporte específicos para esses produtos da digestão proteica (BRÖER, 2008; GILBERT; WONG; WEBB Jr, 2008).

3.2.1 Efeito do tipo de enzima

No intuito de se avaliar a influência do tipo de enzima sobre o perfil peptídico dos hidrolisados de WPC, as amostras foram divididas em seis grupos, cada um correspondendo a um valor de E:S (0,5:100 a 8:100), como mostrado na Figura 2.

Observa-se nesta figura a vantagem do emprego da pancreatina sobre a protease do *A. sojae*, em termos de quantidade de grandes peptídeos (F1), uma vez que, para quase todos os valores de E:S utilizados, a primeira enzima levou à obtenção do menor teor, excetuando-se o valor de 0,5:100 para o qual não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos pelas duas enzimas. Com relação à soma dos teores de di- e tripeptídeos e de aminoácidos livres (F3+F4), a superioridade da pancreatina pode ser observada em todos os valores de E:S, tendo levado a resultados bem mais elevados do que os obtidos pela protease do *A. sojae*.

Em função das especificidades das enzimas utilizadas, o resultado obtido para a pancreatina era esperado, uma vez que esse preparado enzimático possui atividade tanto de endopeptidases (tripsina e quimiotripsina), quanto de exopeptidases (carboxipeptidases A e B), o que leva ao rompimento da molécula proteica em pontos diversos, favorecendo a liberação de peptídeos menores e de aminoácidos livres. Por outro lado, o perfil peptídico de qualidade inferior obtido pela protease de *Aspergillus sojae* pode ser justificado pelo fato de ser esta uma exopeptidase do grupo das leucil-aminopeptidases (EC 3.4.11.1), capaz de liberar aminoácidos N-terminais, preferencialmente leucina (NC-IUBMB, 2010). Além disso, a marcante diferença entre as atividades proteolíticas destas duas enzimas corrobora, igualmente, para a explicação destes

resultados (5,97 U/mL e 0,63 U/mL, para a pancreatina e a protease do *A. sojae*, respectivamente).

Poucos relatos foram encontrados na literatura abordando o efeito do tipo de enzima sobre o perfil peptídico de hidrolisados de WPC, sendo dois do mesmo grupo de pesquisa do presente trabalho e um de outros pesquisadores. Com relação ao trabalho de outros autores, Pacheco e Sgarbieri (2005) relataram o efeito da ação de três diferentes enzimas (uma pancreatina e duas proteases, sendo uma de *Bacillus sp* e outra de *Bacillus licheniformis*) sobre o teor de aminoácidos livres do WPC, avaliado por cromatografia de troca iônica com derivatização por ninhidrina. Assim, tal como no presente trabalho, a pancreatina foi a mais benéfica das enzimas, tendo liberado maior teor de aminoácidos livres (17,04 %), seguida das proteases de *Bacillus sp.* (4,67 %), e, por último, de *Bacillus licheniformis* (1,86 %).

No primeiro estudo do nosso grupo, Silva *et al.* (2009) utilizaram sete enzimas diferentes para hidrolisar o WPC, das quais duas correspondem às mesmas empregadas no presente trabalho: pancreatina e a protease do *Aspergillus sojae*, usando lotes e condições hidrolíticas diferentes dos que aqui foram empregadas. Tal como no presente trabalho, a pancreatina originou um perfil peptídico superior ao da *A. sojae*. Em outro estudo da mesma equipe, Silva *et al.* (2010) compararam a ação da pancreatina (lotes e condições hidrolíticas diferentes dos que aqui foram empregadas) com a da papaína (endopeptidase), tendo verificado que a primeira, em termos de número de casos, originou hidrolisados com melhores perfis peptídicos, resultado este semelhante ao que aqui foi relatado. Por outro lado, a ação da papaína foi considerada nutricionalmente mais vantajosa, visto que um dos maiores teores de di- e tripeptídeos (15,29%) e um dos menores de grandes peptídeos (25,73%) foram obtidos com essa enzima.

3.2.2 Efeito da relação enzima:substrato

A influência da relação E:S (0,5:100; 1:100; 2:100; 3:100; 4:100 e 8:100) sobre o perfil peptídico de hidrolisados proteicos de WPC pode ser avaliada na Figura 3, onde as amostras foram divididas em dois grupos, cada um correspondendo a uma das enzimas utilizadas.

Inicialmente, observa-se que para a protease do *A. sojae* o menor teor de grandes peptídeos (F1) e a maior soma de F3+F4 foram obtidos quando se empregou a maior relação E:S de 8:100. Para a pancreatina, com relação aos grandes peptídeos, os menores teores foram observados tanto com uma de E:S de 4:100 quanto de 8:100, não tendo havido diferença significativa entre eles. Para a soma de F3+F4, o maior valor foi obtido com uma E:S de 8:100, tal como observado para a protease do *A. sojae*. Conclui-se, portanto, que, para nenhuma destas enzimas foi observada a vantagem da

utilização de uma menor relação E:S na obtenção de um perfil peptídico nutricionalmente adequado.

Foram encontrados trabalhos na literatura em que foi observado o efeito benéfico da utilização de uma menor relação E:S. Assim, ao se utilizar uma pancreatina foi possível obter menor teor de grandes peptídeos e maior de aminoácidos livres, ao se passar de uma E:S de 4:100 para 2:100 (SILVA *et al.*, 2010). Empregando-se uma subtilisina, a vantagem da utilização de menor E:S ocorreu ao se passar de uma E:S de 4:100 para 2:100, assim como de 2:100 para 1:100, tendo sido observados redução do teor de grandes peptídeos e aumento da quantidade de aminoácidos livres (SILVESTRE *et al.*, 2011).

4 Conclusão

Os testes, realizados no presente trabalho com uma protease do *Aspergillus sojae* e uma pancreatina, permitem a obtenção de hidrolisados de WPC com elevado teor de di- e tripeptídeos e aminoácidos livres, assim como quantidade reduzida de grandes peptídeos. A condição mais favorável refere-se ao emprego da pancreatina a uma relação E:S de 8:100, no pH 7,0, a 50 °C, após 5 h de reação.

5 Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

6 Referências

BOZA, J. J.; MOËNNOZ, D.; VUICHOUD, J.; JARRET, A. R.; GAUDARD-DE-WECK, D.; BALLÈVRE, O. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. **European Journal of Nutrition**, v. 39, n. 6, p. 237-243, 2000.

BRANS, G.; SCHROËN, C. G. P. H.; VAN DER SMAN, R. G. M.; BOOM, R. M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, v. 243, n. 2, p. 263-272, 2004.

BRÖER, S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 1, p. 249-286, 2008.

CARREIRA, R. L.; DE MARCO, L. M.; DIAS, D. R.; MORAIS, H. A.; SILVESTRE, M. P. C. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 1, p. 17-25, 2004.

CARREIRA, R. L.; SILVA, V. D. M.; LIMA, L. G.; MORAIS, H. A.; SILVESTRE, M. P. C. Perfil peptídico de

hidrolisados proteicos da farinha de trigo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 4, p. 481-489, 2011.

DELVIVO, F. M.; SILVA, V. D. M.; MORAIS, H. A.; FIGUEIREDO, A. F. S.; AGUIAR, M. J. B.; COELHO, J. V.; SILVESTRE, M. P. C. Desenvolvimento de formulação dietética para fenilcetonúricos à base de hidrolisados de soro de leite. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 20, n. 3, p. 117-126, 2005.

FRENHANI, P. B.; BURINI, R. C. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos: controle e implicações na dietoterapia humana. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 36, n. 4, p. 227-237, 1999.

GANAPATHY, V.; GUPTA, N.; MARTINDALE, R. G. **Protein digestion and absorption**. In: JOHNSON, L. R.; BARRET, K. E.; GISHAN, F. K.; MERCHANT, J. L.; SAID, H. D. M.; WOOD, J. D. (Ed.). *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Fourth Edition, Burlington: Elsevier Academic Press, Chapter 65, pp.1667-1692, 2006.

GILBERT, E. R.; WONG, E. A.; WEBB Jr, K. E. Peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 9, p. 1493-1501, 2008.

GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M. P.; GUADIX, E. M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular - weight range. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, n. 4, p. 529-532, 1994.

GUADIX, A.; CAMACHO, F.; GUADIX, E. M. Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor. **Journal of Food Engineering**, v. 72, n. 4, p. 398-405, 2006.

KIM, H. J.; BAE, I. Y.; AHN, W.-W.; LEE, S.; LEE, H. G. Purification and identification of adipogenesis inhibitory peptide from black soybean protein hydrolysate. **Peptides**, v. 28, n. 11, p. 2098-2103, 2007.

LOPES, D. C. F.; BIZZOTTO, C. S.; CARREIRA, R. L.; AFONSO, W. O.; LOPES Jr, C. O.; SILVESTRE, M. P. C. Removal of phenylalanine from protein hydrolysates prepared with rice. **Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 57-65, 2008.

LOPES, D. C. F.; DELVIVO, F. M.; SILVESTRE, M. P. C. Hydrolysates of skim milk: peptide profile using two proteolytic enzymes. **British Food Journal**, v. 107, n. 1, p. 42-53, 2005.

MORAIS, H. A.; DE MARCO, L. M.; OLIVEIRA, M. C.; SILVESTRE, M. P. C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. **Acta Alimentaria**, v. 34, n. 1, p. 59-69, 2005.

MORATO, A. F.; CARREIRA, R. L.; JUNQUEIRA, R. G.; SILVESTRE, M. P. C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, n. 5, p. 843-857, 2000.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. **NC-IUBMB**. Enzyme Nomenclature. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>>. Acesso em: 12 jun. 2010.

PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. Effect of different hydrolysates of whey protein on hepatic glutathione content in mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 3, p. 337-342, 2005.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: Livraria Nobel, 477p. 2000.

Journal of Food Science and Technology, v. 39, n. 8, p. 839-850, 2004.

SILVA, M. C.; SILVA, V. D. M.; LANA, A. M. Q.; SILVESTRE, M. P. C. Grau de hidrólise e perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico de soro de leite. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 3, p. 395-402, 2009.

SILVA, M. R.; RODRIGUES, D. F.; LANA, F. C.; SILVA, V. D. M.; MORAIS, H. A.; SILVESTRE, M. P. C. Perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico do soro de leite, obtidos pela ação da papaína e da papaína. **Nutrire**, v. 35, n. 3, p. 97-114, 2010.

SILVA, V. D. M.; DE MARCO, L. M.; AFONSO, W. O.; LOPES, D. C. F.; JANUÁRIO, J. N.; AGUIAR, M. J. B.; STARLING, A. L. P.; SILVESTRE, M. P. C. Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. **American Journal of Food Technology**, v. 2, n. 5, p. 327-341, 2007.

SILVESTRE, M. P. C.; AFONSO, W. O.; LOPES Jr., C. O.; SILVA, V. D. M.; MORAIS, H. A.; SOUZA, M. W. S.; SILVA, M. R. Use of subtilisin and pancreatin for hydrolyzing whey protein concentrate. **American Journal of Food Technology**, v. 6, n. 8, p. 647-660, 2011.

SILVESTRE, M. P. C.; HAMON, M.; YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 12, p. 2778-2782, 1994a.

SILVESTRE, M. P. C.; HAMON, M.; YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 12, p. 2783-2789, 1994b.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins - From 'gutter-to-gold'. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 695-704, 2008.

SOARES, R. D. L.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E. A. R.; SILVESTRE, M. P. C. Enzyme-catalyzed production of oligopeptides from skim milk. **Food Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 45-56, 2007.

SOUZA, M. W. S.; BIASUTTI, E. A. R.; CARREIRA, R. L.; AFONSO, W. O.; SILVA, V. D. M.; SILVESTRE, M. P. C. Obtaining oligopeptides from whey: use of subtilisin and pancreatin. **American Journal of Food Technology**, v. 3, n. 5, p. 315-324, 2008.

SPELLMAN, D.; O'CUINN, G.; FITZGERALD, R. J. Physicochemical and sensory characteristics of whey protein hydrolysates generated at different total solids levels. **Journal Dairy Research**, v. 72, n. 2, p. 138-143, 2005.

STATSOFT. **Statistic for Windows** [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2000.

WHITAKER, J. R.; HAARD, N. F.; SHOEMAKER, C. F. **Handbook of food enzymology**. New York: Marcel Dekker, 2003.

WRÓBLEWSKA, B.; KARAMAC, M.; AMARAOWICZ, R.; SZYMKIEWICZ, A.; TROSZYŃSKA, A.; KUBICKA, W. Immunoreactive properties of peptide fractions of cow whey milk proteins after enzymatic hydrolysis. **International**