

# EFEITOS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM PEPSINA NA FORMAÇÃO DE PEPTÍDEOS E NA CAPACIDADE EMULSIONANTE DE PROTEÍNAS DE SORO DE LEITE

CAROLINE MELLINGER-SILVA<sup>1</sup>; ANA I. S. BRÍGIDA<sup>1</sup>; MARILIA P. STEPHAN<sup>1</sup>; TATIANA DE L. AZEVEDO<sup>2</sup>

## RESUMO

O presente estudo avaliou a hidrólise enzimática de proteínas de soro de leite na presença de pepsina. A curva de hidrólise mostrou intensa atividade enzimática nas primeiras horas da reação, com um aumento de tirosina em 3,5 vezes após 2h de reação e redução da concentração de proteínas em 75%. Os perfis cromatográficos das amostras mostram a formação de uma ampla variedade de peptídeos, cuja maioria parece permanecer presente ao longo da reação. As frações hidrolisadas foram ainda avaliadas quanto à capacidade emulsionante, que apresentou um leve aumento após 1h de reação. Os resultados obtidos evidenciam a potencialidade da pepsina como biocatalisador para hidrólise de proteínas de soro de leite, de forma que os estudos deverão ser aprofundados visando um melhor aproveitamento deste coproduto.

**PALAVRAS-CHAVE:** proteínas do soro de leite; peptídeos; hidrólise enzimática; propriedade emulsionante.

## ABSTRACT

This study assessed the enzymatic hydrolysis of whey proteins in the presence of pepsin. The curve showed an intense hydrolysis activity of the enzyme in the early hours of the reaction, with an increase of 3.5 times of tyrosine after 2h-reaction, with a protein reduction of 75%. The chromatographic profiles of the samples showed the formation of a wide variety of peptides, most of which seems to remain present throughout the reaction. The hydrolyzed fractions were also evaluated for the emulsifying capability, which showed a slight increase after 1h-reaction. The results show the potential of pepsin as biocatalyst for hydrolysis of whey proteins so they must be further developed studies aiming at better utilization of this coproduct.

**KEYWORDS:** whey proteins; peptides; enzymatic hydrolysis; emulsifying property.

## INTRODUÇÃO

O soro de leite é um coproduto de ampla utilidade na alimentação humana. Muitos estudos mostram que a hidrólise enzimática parcial das proteínas do soro de leite pode incrementar as propriedades nutricionais e funcionais deste coproduto, pois, além de tornarem o material mais facilmente digerível, podem gerar peptídeos bioativos (MADUREIRA *et al.*, 2010) e favorecer ou manter as propriedades tecnológicas do material (HERNÁNDEZ-LEDESMA *et al.*, 2010). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de hidrólise das proteínas do soro de leite submetidas à ação

<sup>1</sup> Pesquisador Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro – RJ, [caroline.mellinger@embrapa.br](mailto:caroline.mellinger@embrapa.br).

<sup>2</sup> Analista Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro – RJ,

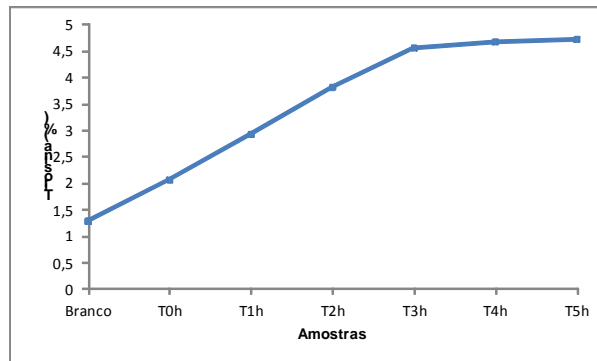
da pepsina, caracterizando as alterações do perfil proteico, os peptídeos formados e a propriedade emulsionante das frações hidrolisadas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

**Hidrólise enzimática:** O isolado proteico de soro de leite (WPI) foi solubilizado em HCl (0,1M) (1,25%, *p/v*) e submetido à 37 °C, pH=2,0. Desta solução foi coletado o branco da amostra (Br). Em seguida, foram adicionados 10,5 mL de solução de pepsina (0,1%, *p/v*). Foi realizado amostragem do sistema reacional a intervalos de 1 hora, durante 5 horas de reação. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético a 10% (*p/v*), na proporção 1:1, ou por aquecimento a 80 °C por 5 min. As amostras foram analisadas quanto ao teor de tirosina livre (GOODWIN e MORTON, 1946), a capacidade emulsionante e perfil peptídico. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976). **Perfil de peptídeos:** Utilizou-se um sistema UFLC (Shimadzu, LC-20AD), com detector UV e coluna C18. A fase móvel foi realizada em gradiente (5 – 90%, *v/v*) de acetonitrila em água, contendo 0,1% de ácido trifluoroacético. O fluxo foi de 0,4 mL/min e a detecção foi em 216 nm. **Capacidade emulsionante:** Esta foi avaliada através da determinação do índice de emulsificação da solução proteica em hexadecano P.A. Para tanto, 1 mL de amostra foi adicionada a 1mL de hexadecano, em tubo de ensaio, e a mistura submetida a agitação em vortex, por 3 minutos. Ao fim da agitação, o sistema foi mantido sob repouso por 24 horas e, posteriormente, realizou-se a medida da altura total (At) da solução e da altura da fase emulsionada (Ae). O índice de emulsificação (IE, %) foi calculado de acordo com a Equação 1:  $IE(\%) = (Ae/At) \times 100$ .

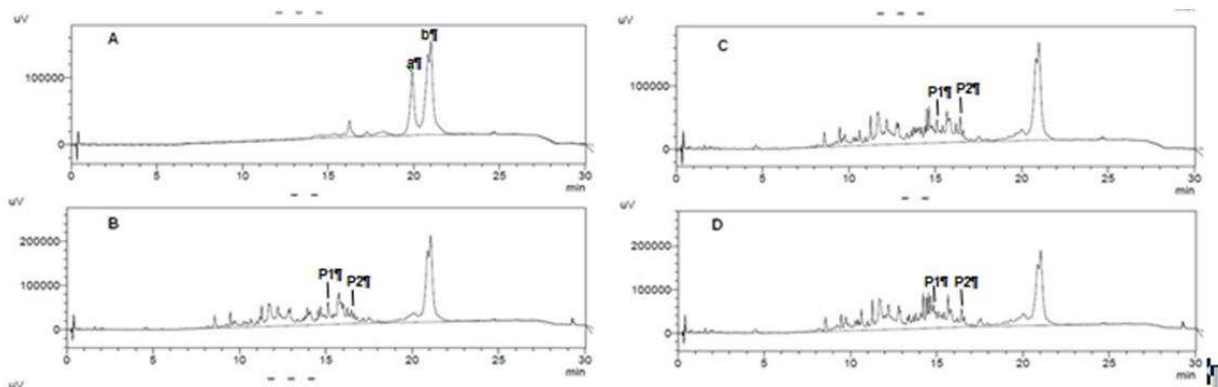
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A Figura 1 mostra o percentual de tirosina ao longo da reação, o qual aumentou 2,2 vezes após 1h de reação e 3,5 vezes após 3h. Após 2 h de reação a quantidade de proteínas detectadas diminuiu em 75%, apontando para uma intensa hidrólise até a segunda hora de reação. A partir de 3 horas de reação, observou-se estabilização do percentual de tirosina e teor de proteína no meio reacional.



**FIGURA 1.** Curva de hidrólise do isolado proteico de soro de leite biocatalisada por pepsina. Branco – amostra sem adição de enzima; T0 a T5 – amostras coletadas nos tempos de hidrólise entre 0 e 5 horas, sequencialmente.

As amostras hidrolisadas foram coletadas e analisadas por UFLC. A Figura 2A mostra o perfil proteico do WPI, sem adição de enzima. Pode-se observar a presença majoritária das principais proteínas do soro de leite: a  $\alpha$ -lactoalbumina (a) e  $\beta$ -lactoglobulina (b). As figuras 2(B), 2(C) e 2(D) mostram os perfis cromatográficos das amostras após 1, 2 e 4 horas de reação, respectivamente.

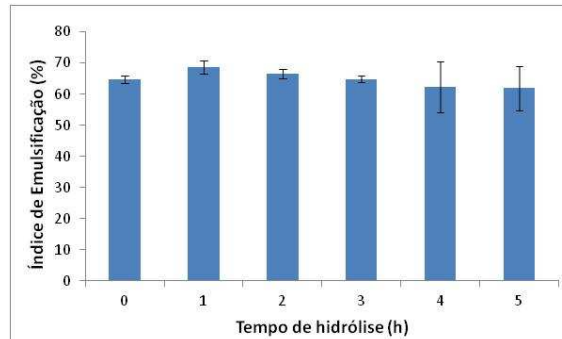


**FIGURA 2.** Perfil de peptídeos do WPI no sistema reacional de hidrólise com pepsina. (A) Branco. a –  $\alpha$ -lactoalbumina; b –  $\beta$ -lactoglobulina, (B) 1 h, (C) 2 h e (D) 4 h de reação.

Comparando-se os resultados entre os cromatogramas, nota-se a rápida ação enzimática, com a identificação de 69 picos após a primeira hora de hidrólise. Maior ação proteolítica da pepsina ocorre sobre a  $\alpha$ -lactoalbumina, observando-se um leve aumento na intensidade dos picos referentes aos peptídeos de menor massa (tempo de retenção < 13 min) e baixa ação sobre de  $\beta$ -lactoglobulina, mesmo após 4 h de hidrólise.

As frações hidrolisadas entre 0h e 5h foram também submetidas à análise da capacidade emulsificante em solução. Os dados da Figura 3 mostram o maior índice de emulsificação após 1h de hidrólise. O ganho de capacidade emulsificante, embora

estatisticamente significativo, foi pequeno, passando de  $64,7 \pm 1,3$  % para  $68,6 \pm 2,2$  %. Após 1h de reação, observou-se uma pequena queda nos índices de emulsificação até 5h. O que implica dizer que não há perdas significativas no seu potencial emulsionante com a hidrólise catalisada por pepsina nas condições reacionais utilizadas.



**FIGURA 3.** Avaliação do efeito da hidrólise de isolado proteico de soro de leite com pepsina na capacidade emulsionante da solução.

## CONCLUSÃO

O WPI foi parcialmente hidrolisado por pepsina, apresentando redução de 75% da concentração de proteínas, em especial da  $\alpha$ -lactoalbumina, em 3h de reação, sem redução significativa da capacidade emulsionante. Os resultados obtidos evidenciam a potencialidade da pepsina como biocatalisador para hidrólise de proteínas de soro de leite, de forma que os estudos deverão ser aprofundados visando um melhor aproveitamento deste coproduto.

## REFERÊNCIAS

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

GOODWIN, T. W.; MORTON, R. A. The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. **Biochemistry Journal**, v. 40, p. 628-632, 1946.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; CONTRERAS, M. M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, p. 23-35, 2010.

MADUREIRA, A. R.; TAVARES, T.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 437-455, 2010.