

# OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS TRÍPTICOS DE SORO DO LEITE E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE EMULSIONANTE DOS HIDROLISADOS

CAROLINE MELLINGER-SILVA<sup>1</sup>; ANA I. S. BRÍGIDA<sup>1</sup>; MARILIA P. STEPHAN<sup>1</sup>; CARLOS BLOCH Jr.<sup>2</sup>; MAURA V. PRATES<sup>2</sup>; LUCIANO P. SILVA<sup>2</sup>

## RESUMO

Este estudo avaliou a hidrólise enzimática de proteínas de soro de leite por tripsina. A curva de hidrólise mostrou um aumento de tirosina em 6 vezes após 3h de reação e redução da concentração de proteínas em 54%. Os perfis cromatográficos das amostras mostram a formação de uma ampla variedade de peptídeos, sendo aqueles de maior concentração, oriundos da  $\beta$ -lactoglobulina. As frações hidrolisadas foram ainda avaliadas quanto à capacidade emulsionante e foi observado um índice de emulsificação superior à 60% em todos os tempos avaliados, sendo o tempo de 4h o que apresentou melhor índice (68,5%  $\pm$ 0,8). Os resultados obtidos evidenciam a potencialidade da tripsina como biocatalisador para hidrólise de proteínas de soro de leite, de forma que os estudos deverão ser aprofundados.

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

## ABSTRACT

This study assessed the enzymatic hydrolysis of whey proteins by trypsin. The curve showed an intense hydrolysis activity of the enzyme in the early hours of the reaction, with an increase of 6 times of tyrosine after 3h-reaction with a protein reduction of 54%. The chromatographic profiles of the samples showed the formation of a wide variety of peptides, those of higher concentration were from  $\beta$ -lactoglobulin. The hydrolyzed fractions were also evaluated for the emulsifying capacity. It was observed an emulsifying index higher than 60% for all tested fractions, and the time of 4h was the best rated (68.5%  $\pm$  0.8). The results show the potential of trypsin as biocatalyst for hydrolysis of whey proteins so they must be further developed studies.

**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 insumo (HERNÁNDEZ-LEDESMA *et al.*, 2010). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de hidrólise das proteínas do soro de leite biocatalisada por

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

<sup>2</sup> Pesquisador Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF.

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

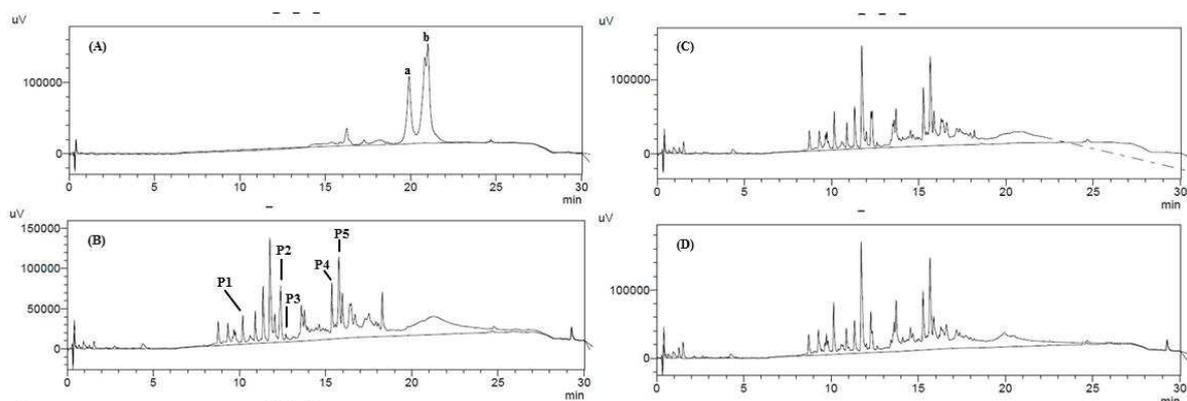
## MATERIAL E MÉTODOS

**Hidrólise enzimática:** Foi realizada com isolado proteico de soro de leite (WPI) a 5% (*p/v*), 37 °C, pH=8,0 (branco). A solução de tripsina (0,3%, *p/v*) foi adicionada e a reação ocorreu ao longo de 5 horas, com alíquotagem a cada hora. Ao término, as amostras foram analisadas quanto ao teor de tirosina (GOODWIN e MORTON, 1946), proteína (BRADFORD, 1976) e capacidade emulsionante. **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência:** Foram realizadas em um sistema UFLC (Shimadzu, LC-20AD), com detector UV e coluna C18. A fase móvel foi realizada em gradiente (5 – 90%) 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. **Espectrometria de Massa:** Experimentos realizados em MALDI-TOF/TOF (AutoFlex III, software Flexcontrol 3.0; Bruker Daltonics). As amostras ressolubilizadas foram adicionadas da matriz HCCA (1:2, *v/v*) e aplicadas na placa de amostra, em duplicata. As massas monoisotópicas dos peptídeos foram obtidas no modo refletivo positivo, tendo realizado a calibração externa (*Peptide Calibration Standard I*, Bruker Daltonics) e os espectros de massa MS/MS foram obtidos sob o modo de operação LIFT™. As estruturas primárias dos peptídeos foram obtidas por meio da interpretação manual *de novo* dos espectros de fragmentação. A busca pelas sequências similares das proteínas foi realizada nos bancos de dados *Swiss-Prot Database* e *Protein Blast*. **Capacidade emulsionante:** Foi avaliada através da determinação do índice de emulsificação da solução proteica em hexadecano P.A. 1 mL de amostra foi adicionada a 1mL de hexadecano, em tubo de ensaio, e a mistura agitada em vortex, por 3 minutos. Após 24 horas, 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

Os resultados da hidrólise do soro de leite foram expressivos a partir de 1 hora de reação, mas após 3 horas observou-se um intenso aumento de tirosina em 6 vezes, com redução do teor de proteínas em 54%. As amostras hidrolisadas foram coletadas e analisadas por UFLC. A Figura 1A mostra o perfil proteico do WPI, sem adição de enzima. Na figura, pode-se observar a presença majoritária das principais proteínas do

soro de leite: a  $\alpha$ -lactoalbumina (a) e  $\beta$ -lactoglobulina (b). As figuras 1(B), 1(C) e 1(D) mostram os perfis cromatográficos das amostras após 1, 2 e 4 horas de reação, respectivamente. Os cromatogramas mostram a rápida ação enzimática sobre as proteínas. Também é possível observar pouca alteração dos perfis peptídicos ao longo do tempo, bem como a elevada redução dos picos referentes à  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina.



**FIGURA 1.** Cromatogramas do WPI hidrolisado com tripsina. (A) Branco. a –  $\alpha$ -lactoalbumina; b –  $\beta$ -lactoglobulina, (B) 1 h, (C) 2 h e (D) 4 h de reação.

A intensa ação da tripsina sobre a  $\beta$ -lactoglobulina pôde ser confirmada ao analisar as estruturas primárias de peptídeos isolados (Tabela 1), dentre os quais, 4 apresentaram 100% de homologia com a proteína, quando comparadas às sequências em banco de dados. Este resultado é interessante, pois com a hidrólise desta proteína, ocorre a diminuição da característica alergênica de produtos lácteos. Também pôde-se identificar a presença de um peptídeo da peptona proteose, uma proteína que também apresenta certo caráter alergênico.

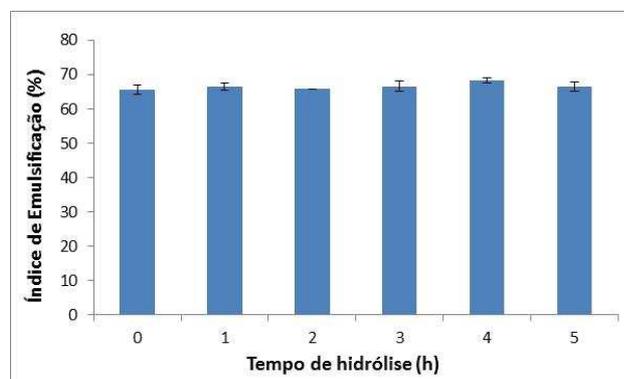
**TABELA 1.** Sequência de aminoácidos e massas moleculares dos peptídeos caracterizados no hidrolisado de WPI.

Fração	Mw <sub>e</sub> (Da)	Sequência de aminoácidos	Proteína de Origem	Número de Acesso
P1	1.245,63	TPEVDDEALEK	$\beta$ -lactoglobulina	P02754
P2	1.635,61	TPEVDDEALEKFDK	$\beta$ -lactoglobulina	P02754
P3	2.723,19	LLNKPEDETKLEAQPTDASAQFL	Peptona protease	P80195
P4	2.030,06	SLAMAASDISLLDAQSAPLR	$\beta$ -lactoglobulina	P02754
P5	2.295,67*	VYVEELKPTPEGDLEILLQK	$\beta$ -lactoglobulina	P02754

P1 a P5 – peptídeos analisados; Mw<sub>e</sub> – massa molecular experimental; \*massa molecular teórica.

As frações hidrolisadas entre 0h e 5h foram também submetidas à análise da capacidade emulsificante em solução. Os dados da Figura 2 mostram um aumento no

índice de emulsificação durante a hidrólise para os tempos de 0 a 4 horas de reação. O ganho de capacidade emulsificante foi pequeno, embora estatisticamente significativo, passando de  $65,7 \pm 1,3$  % em 0 hora para  $68,5 \pm 0,8$  % após 4 horas de reação. Este dado pode ser tecnologicamente interessante, pois, independente da escolha do tempo de hidrólise, o material continua a apresentar tal propriedade.



**FIGURA 2.** Avaliação do efeito da hidrólise de WPI com tripsina na capacidade emulsionante da solução.

## CONCLUSÃO

O uso de tripsina na hidrólise de WPI possibilitou a hidrólise tanto da  $\alpha$ -lactoalbumina quanto da  $\beta$ -lactoglobulina desde a primeira hora de reação sem alterar a capacidade emulsionante da solução. Os resultados obtidos evidenciam a potencialidade da tripsina como biocatalisador para hidrólise de proteínas de soro de leite, especialmente na obtenção de produtos hipoalérgicos.

## 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.