

ORIGINAL ARTICLE

Avaliação do potencial antioxidante de proteínas do soro de leite concentradas por ultrafiltração e hidrolisadas por diferentes proteases comerciais

Evaluation of the antioxidant potential of whey protein concentrated by ultrafiltration and hydrolyzed by different commercial proteases

Renata Silva Cabral de Souza¹, Renata Valeriano Tonon², Marília Penteadó Stephan²,
Caroline Mellinger Silva², Ana Lúcia Penteadó³, Lourdes Maria Corrêa Cabral²,
Louise Emy Kurozawa^{1,4*} 

¹Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Seropédica/RJ - Brasil

²Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro/RJ - Brasil

³Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna/SP - Brasil

⁴Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Engenharia Alimentos, Campinas/SP - Brasil

*Corresponding Author: Louise Emy Kurozawa, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Engenharia Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Rua Monteiro Lobato, 80, CEP: 13083-862, Campinas/SP - Brasil, e-mail: louisek@unicamp.br

Cite as: Souza, R. S. C., Tonon, R. V., Stephan, M. P., Silva, C. M., Penteadó, A. L., Cabral, L. M. C., & Kurozawa, L. E. (2019). Evaluation of the antioxidant potential of whey protein concentrated by ultrafiltration and hydrolyzed by different commercial proteases. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22, e2018021. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.02118>

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana de hidrolisados proteicos de soro de leite obtidos por diferentes proteases (Alcalase e Flavourzyme) e sua mistura (proporção 50:50). Previamente à hidrólise enzimática, o soro de leite foi concentrado por ultrafiltração com membranas cerâmicas tubulares. A reação enzimática foi realizada de acordo com o método pH-stat, sendo coletadas alíquotas com diferentes graus de hidrólise (GH), ao longo de cada hidrólise proteica. Os hidrolisados foram analisados quanto a estimativa do teor de peptídeos, atividade antioxidante pelos métodos de captura do radical livre ABTS⁺ e do radical peroxila (*Oxygen radical antioxidant capacity* - ORAC), eletroforese e atividade antimicrobiana. Os máximos GH alcançados foram 15%, 52% e 63%, para Flavourzyme, mistura das enzimas e Alcalase, respectivamente. A atividade antioxidante aumentou com o GH. Os hidrolisados proteicos obtidos pela Alcalase apresentaram maiores atividades antioxidantes que os outros hidrolisados. Entretanto, nenhum hidrolisado proteico apresentou atividade antimicrobiana contra as cepas de *Salmonella choleraesuis* subsp. *Enteritidis* (ATCC 13076) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 9117).

Palavras-chave: Peptídeos; Hidrólise enzimática; Grau de hidrólise; Eletroforese; Capacidade antioxidante.



Este é um artigo publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), que permite uso, distribuição e reprodução em qualquer meio, sem restrições desde que o trabalho original seja corretamente citado.

Abstract

The objective of this work was to evaluate the antioxidant and antimicrobial activities of whey protein hydrolysates obtained using different commercial proteases (Alcalase and Flavourzyme) as well as their blend (50:50 ratio). Prior to the enzymatic hydrolysis, the whey was concentrated by ultrafiltration using tubular ceramic membranes. The enzymatic reaction was carried out according to the pH-stat method, in which aliquots were collected with different degrees of hydrolysis (DH) during the protein hydrolysis. The protein hydrolysates were evaluated with respect to the estimated peptides content, antioxidant activity by capture of free radical ABTS⁺ and the peroxy radical (Oxygen radical antioxidant capacity - ORAC) methods, electrophoresis and antimicrobial activity. The maximum DH values reached were: 15%, 52% and 63% for Flavourzyme, the blend of enzymes and Alcalase, respectively. The antioxidant activity increased with the DH. The protein hydrolysates obtained using Alcalase presented higher antioxidant activities than the other samples. However, no samples presented antimicrobial activity against *Salmonella choleraesuis subsp. Enteritidis* (ATCC 13076) or *Listeria monocytogenes* (ATCC 9117).

Keywords: Peptides; Enzymatic hydrolysis; Degree of hydrolysis; Electrophoresis; Antioxidant activity.

1 Introdução

O soro de leite é um coproduto gerado em quantidades substanciais pela indústria de laticínios. Devido ao seu elevado teor de matéria orgânica e à alta demanda química e bioquímica de oxigênio, é um potencial poluidor de ambientes aquáticos, quando descartado de forma inadequada (Koutinas et al., 2007). Assim, busca-se cada vez mais a diversificação dos processos aos quais é submetido este coproduto, no intuito de reduzir seu possível impacto ambiental, agregar valor e, principalmente, aproveitar suas propriedades tecnológicas, fisiológicas e funcionais (Brandelli et al., 2015; Antunes, 2003).

Devido ao seu elevado conteúdo de proteínas de alto valor biológico (12% a 14%, base seca), o soro de leite é amplamente utilizado pela indústria alimentícia como agente gelificante, estabilizante, emulsificante e espumante, e como ingrediente para pães, bolos e bebidas lácteas (Antunes, 2003). Também pode ser utilizado pela indústria farmacêutica, uma vez que as proteínas do soro de leite são uma fonte de peptídeos bioativos que possuem efeitos benéficos à fisiologia humana, tais como função antioxidante (Le Maux et al., 2016; Contreras et al., 2011) e antimicrobiana (Demers-Mathieu et al., 2013).

De acordo com Vioque et al. (2006), os peptídeos bioativos são fragmentos específicos de proteína e seus efeitos benéficos na saúde são atribuídos à presença e/ou sequência de aminoácidos na estrutura proteica. A capacidade antioxidante dos peptídeos está relacionada com o mecanismo de ação de alguns aminoácidos presentes. Aminoácidos ácidos e básicos são principalmente agentes quelantes de íons metálicos. Já aminoácidos que doam elétrons e/ou prótons ou que contenham grupamentos sulfidrila apresentam a capacidade de atuarem como sequestradores de radicais livres (Samaranayaka & Li-Chan, 2011; Sarmadi & Ismail, 2010). Com relação à capacidade antimicrobiana, de modo geral, os peptídeos atuam na membrana plasmática dos micro-organismos através de ligações eletrostáticas e entre os grupos hidrofóbicos dos peptídeos e os lipídeos presentes na membrana. Tal fato altera a permeabilidade da membrana plasmática, podendo provocar a ruptura e desintegração da célula. Também, os peptídeos podem se difundir para o interior da célula e alterar os componentes intracelulares, interferindo nas funções vitais da célula (Benkerroum, 2010).

Tais peptídeos encontram-se em estado inativo quando inseridos na cadeia polipeptídica da proteína, podendo ser liberados através da hidrólise enzimática da proteína. O tipo da enzima, o grau de hidrólise e o pré-tratamento do substrato afetam significativamente a atividade biológica dos peptídeos bioativos (Sbroggio et al., 2016; Polanco-Lugo et al., 2014). A protease Alcalase é uma endopeptidase, que possui ação catalítica nas regiões internas das cadeias polipeptídicas, resultando na formação de peptídeos de baixo peso molecular. Já a Flavourzyme é uma mistura enzimática composta por aminopeptidases, dipeptidilpeptidases

e endopeptidases. As aminopeptidases atuam sobre as ligações peptídicas na extremidade do substrato, no N terminal, liberando aminoácidos; já as dipeptidilpeptidases liberam dipeptídeo N terminal da proteína (Merz et al., 2015).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana de hidrolisados proteicos de concentrado de soro de leite com diferentes graus de hidrólise, obtidos pela ação da endopeptidase Alcalase, da exopeptidase Flavourzyme e da mistura destas.

2 Material e métodos

2.1 Material

Concentrado proteico de soro de leite bovino em pó, com 34% de proteína, foi fornecido pela Alibra[®] Ingredientes (Campinas-SP). Para hidrólise proteica, foram utilizadas as proteases comerciais (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) Alcalase[®] 2.4 L FG, uma serine endopeptidase de origem microbiana, produzida a partir de *Bacillus licheniformis*, e Flavourzyme[®] 1000 L, uma mistura enzimática composta por leucine aminopeptidases, dipeptidilpeptidases, serine e metalo endopeptidases, e α -amilase, também de origem microbiana, produzida a partir de *Aspergillus oryzae*.

2.2 Concentração proteica por ultrafiltração

Inicialmente, o concentrado proteico de soro em pó foi reconstituído em água destilada em uma concentração de 0,8 g proteínas/100 g, a mesma encontrada no soro de leite *in natura* (Antunes, 2003). Uma vez que as indústrias processadoras de soro geralmente realizam a sua concentração antes de diversos processos, o soro de leite reconstituído foi então concentrado por ultrafiltração (UF) antes de ser submetido à hidrólise enzimática. A UF, processo que consiste na passagem de um produto por uma membrana seletiva, foi escolhida, no presente trabalho, por ser uma realidade economicamente viável, observada atualmente em laticínios no Brasil.

No processo de UF, utilizou-se um sistema com quatro módulos tubulares de membranas cerâmicas, com diâmetro médio dos poros de 20 kDa (Techniques Industrielles Appliquées, Bollene, França). A condição de processo, definida em testes preliminares, foi: 40 °C, pressão aplicada à membrana de 5 bar, vazão de recirculação de 900 L/h e área filtrante total de 0,022 m². O processo foi conduzido até atingir um fator de concentração volumétrico mínimo de dois. O fluxo médio de permeado obtido ao final da UF foi de 51,4 kg/(h.m²). As frações retida e permeada apresentaram concentrações de proteínas solúveis de 1,67 ± 0,08 mg/mL e 0,02 ± 0,00 mg/mL (Bradford, 1976), respectivamente, sendo que a alimentação inicial apresentava uma concentração de 0,65 ± 0,03 mg/mL.

2.3 Hidrólise enzimática proteica

Para todos os ensaios de hidrólise, utilizou-se um reator encamisado acoplado a um banho termostático com circulação externa para controle da temperatura. Para cada tipo de enzima, foi feita a hidrólise enzimática proteica do concentrado de soro de leite. A amostra, sob agitação por agitador magnético, foi inicialmente aquecida na temperatura desejada e seu pH ajustado com solução de NaOH. As condições de reação para a Alcalase foram 60 °C e pH 8,0, e para a Flavourzyme, foram 50 °C e pH 7,0, definidas de acordo com o fabricante da enzima. Para a mistura de enzimas (proporção 50:50), a condição utilizada foi 50 °C e pH 8,0 (Nchienzia et al., 2010). Em seguida, foi feita adição da enzima [5 g/100 g proteínas, concentração baseada nos resultados reportados por Mutilangi et al. (1995) e Morais et al. (2015)] à amostra e a reação foi monitorada, titulando-se manualmente e continuamente NaOH, de modo a manter o pH constante.

Para o cálculo do grau de hidrólise, o conteúdo de NaOH consumido foi monitorado em função do tempo, até que as variações do consumo da base fossem insignificantes (<1 mL/h). O processo foi avaliado pelo grau de hidrólise (*GH*), determinado pelo método pH-stat (Adler-Nissen, 1985). O *GH* foi definido como sendo o número de ligações peptídicas hidrolisadas, expresso em equivalentes de hidrólise, em relação ao número total de ligações peptídicas antes da reação (Adler-Nissen, 1985).

Para determinação das curvas de cinética de hidrólise (*GH versus tempo*), foram utilizados 500 mL de soro de leite concentrado. Para obtenção de hidrolisados proteicos com diferentes *GH*, foi realizada outra hidrólise enzimática de 1 L de amostra, com retirada de alíquotas (200 mL) em diferentes tempos de reação (Tabela 1). Após coleta, as alíquotas sofreram tratamento térmico a 80 °C por 15 min, para inativação enzimática. Cerca de 180 mL de cada alíquota foram congelados e posteriormente liofilizados, sendo 20 mL mantidos congelados a -10 °C. A fração liofilizada foi utilizada para análise de atividade antimicrobiana e caracterização dos peptídeos por eletroforese Tricina SDS-PAGE. A fração congelada foi avaliada quanto a atividade antioxidante e quantificação dos peptídeos pelo método de tirosina.

Tabela 1. Alíquotas, com diferentes graus de hidrólise (*GH*), obtidas em diferentes tempos de hidrólise proteica pela ação da Alcalase, da Flavourzyme e da mistura destas enzimas.

Enzima	Alíquota	GH (%)	Tempo (min)
Alcalase	A1	0,0	0
	A2	15,7	5
	A3	31,5	18
	A4	47,2	70
	A5	63,0	360
Flavourzyme	F1	0,0	0
	F2	3,8	10
	F3	7,7	20
	F4	11,5	60
	F5	15,0	360
Mistura	M1	0,0	0
	M2	13,0	10
	M3	26,0	35
	M4	39,0	100
	M5	52,0	360

2.4 Métodos analíticos

2.4.1 Tricina-dodecilsulfato de sódio em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil eletroforético foi determinado de acordo com Schägger & Von Jagow (1987), utilizando gel de tricina SDS-PAGE. O gel correu inicialmente a 30 V, aumentando para 77 V, quando a amostra atingiu o gel de separação, e na etapa final, aumentou-se a corrente elétrica para 100 V. O sistema de eletroforese foi o Protean II xi cell (Bio Rad) e o padrão proteico com faixa de massa molecular entre 1,06 a 26,6 kDa (Sigma Aldrich).

2.4.2 Estimativa da dosagem de peptídeos pelo método da tirosina

A quantificação dos peptídeos gerados na hidrólise enzimática foi realizada segundo o método descrito por Chang-Lee et al. (1989), usando a técnica de detecção de tirosina por ultravioleta após precipitação das proteínas com ácido tricloroacético a 10%. A leitura foi feita em espectrofotômetro (Biospectro, modelo SP-220) a 280 nm. Foi construída uma curva padrão com diferentes concentrações de tirosina (Sigma Aldrich), variando de 0,25 a 1,6 µg/mL. As análises foram realizadas em duplicata.

2.4.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante (AA) *in vitro* dos hidrolisados proteicos foi determinada por dois métodos: pela captura do radical livre ABTS⁺ e do radical peroxila (*Oxygen radical antioxidant capacity* - ORAC). Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados de capacidade antioxidante foram expressos como μM Trolox equivalente (TE). A atividade antioxidante pelo método ABTS foi determinada de acordo com Re et al. (1999). Para a preparação do radical ABTS⁺, foram adicionados, em um frasco âmbar, 15 mL de solução aquosa de ABTS [ácido 2,2 azino-bis (3-etilbenzotiazolína-ácido 6-sulfônico) 7 mM e 264 μL da solução de K_2SO_5 140 mM]. O frasco foi deixado em repouso, no escuro, por aproximadamente 16 h, para estabilização da solução. A solução de ABTS⁺ foi diluída em tampão fosfato de sódio pH 7,4 até atingir uma absorbância de $0,700 \pm 0,020$ a 734 nm. As amostras sofreram reação com a solução do radical ABTS⁺ (proporção 1:10) durante 6 min e as absorbâncias foram lidas a 734 nm (Biospectro, modelo SP-220). Foi construída uma curva padrão de Trolox (ácido 6-hidroxi-2-5-7-8-tetrametilcromo 2-carboxílico), com concentrações variando de 20 a 1600 μM , em tampão fosfato pH 7,4.

Para o método ORAC, foram preparadas soluções de fluoresceína 78 nM, obtidas a partir de uma solução estoque de 78 μM e de AAPH [dicloridrato de 2,2, Azobis (2-metilpropionamida)] 221 mM. Todos os reagentes foram diluídos em solução tampão fosfato de sódio 75 mM em pH 7,4. A curva padrão de Trolox foi construída com concentrações variando de 20 a 120 μmol Trolox/L. O equipamento utilizado foi R Chisto (Infinite M200, Tecan, Suíça) com leitor de microplacas de poliestireno, com 96 poços de aplicação na cor preta. Foram aplicados 80 μL de amostra e dispensados pelo equipamento 80 μL de fluoresceína e 40 μL de AAPH, perfazendo um volume total de 200 μL em cada poço. A fluorescência foi registrada durante 150 ciclos por cerca de 3 h. A leitura da fluorescência foi feita a 40 °C e em comprimentos de onda de excitação e de emissão de 485 e 520 nm, respectivamente (Contreras et al., 2011).

2.4.4 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada contra cepas de *Salmonella choleraesuis* subsp *Enteritidis* CT (ATCC 13076) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 9117), pela metodologia de difusão em ágar (Wan et al., 1998). As bactérias foram ativadas em meio de cultura ágar soja tripticaseína a 45 °C, para *Salmonella*, e ágar soja tripticaseína suplementado com extrato de levedura (Becton, Dickinson and Company, França) a 45 °C, para *Listeria*. A concentração do inóculo em solução salina foi ajustada para densidade ótica de 0,3 na escala Mcfarland (1×10^8 UFC/mL), obtida através da leitura no densitômetro (Densimat, Biomerieux, França). Cerca de 70 mL de cada meio foram transferidos para placas de Petri e, após solidificação, foram feitos os poços. Os hidrolisados foram liofilizados para serem solubilizados a uma concentração de 0,2 g/mL em tampão fosfato de sódio pH 7,4. Foram aplicados 40 μL das amostras, em duplicata, e os controles negativo (tampão fosfato de sódio pH 7,4) e positivo (clorexidina a 0,12%), em seus respectivos poços.

2.5 Análise estatística

Os resultados experimentais foram analisados estatisticamente pelo programa XLSTAT versão 7.5, (Addinsoft, 1995-2004) através da Análise de Variância (ANOVA) aplicando-se o Teste de Tukey no nível de 5% de significância.

3 Resultados e discussão

3.1 Hidrólise enzimática do soro de leite concentrado por UF

As curvas de cinética de hidrólise enzimática (*GH versus* tempo) por diferentes proteases estão expostas na Figura 1. Foi observado um comportamento comum a todas as curvas, com uma alta taxa de hidrólise inicial, devido ao elevado número de ligações peptídicas clivadas na primeira hora de reação. Após este período, foi verificada uma redução na taxa de hidrólise até a estabilização do *GH*, caracterizando o final do processo.

Essa diminuição da velocidade de reação pode ocorrer devido à inibição da enzima pelos produtos gerados; ao efeito da concorrência entre produto e substrato; à diminuição de sítios de hidrólise disponíveis, ou ainda pela autodigestão enzimática.

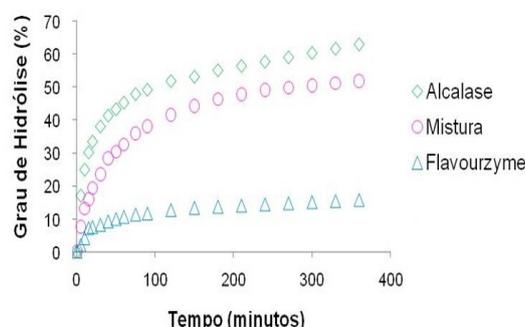


Figura 1. Curvas de cinética de hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite com as diferentes enzimas comerciais e a mistura enzimática.

As cinéticas de hidrólise enzimática revelam que maiores valores de *GH* foram alcançados pela ação da Alcalase, quando comparados com os obtidos pela Flavourzyme, indicando que a primeira enzima hidrolisou mais ligações que a segunda. Comportamento semelhante foi reportado também por Kim et al. (2007), para proteínas do soro de leite. Entretanto, Bamdad et al. (2011) observaram um resultado oposto, em que maiores *GH* foram obtidos para a Flavourzyme. Tal fato pode ser explicado por causa das distintas ações catalíticas, com acessibilidades específicas na cadeia proteica. Alcalase é uma endopeptidase com ampla especificidade de ligações peptídicas para hidrólise com atividade enzimática de 2,4 AU/g (unidade Anson/g, determinada com hemoglobina como substrato). Por outro lado, a Flavourzyme é uma mistura enzimática composta por amino-, dipeptidil- e endopeptidases, conferindo uma ampla ação; logo, maiores valores de *GH* eram esperados quando comparados com a hidrólise por Alcalase (Merz et al., 2015; Pedroche et al., 2002). Merz et al. (2015) verificaram que cada enzima que compõe a Flavourzyme possui temperatura e pH ótimos. No presente trabalho, a hidrólise foi conduzida a 50 °C e pH 7,0, condição ótima para um tipo de dipeptidilpeptidase (atividade enzimática de 133 nkat/mg, unidade katal/mg, determinada com p-nitroanilina como substrato) e para dois tipos de endopeptidases (atividades enzimáticas de 775 e 495 ACU/mg, unidade azocaseína/mg, determinada com azocaseína como substrato) (Merz et al., 2015). Entretanto, maiores valores de *GH* obtidos para a reação com Alcalase podem indicar que a atividade enzimática da Alcalase é maior do que a das enzimas que compõem a Flavourzyme. Contudo, como as unidades de atividade enzimática das enzimas são diferentes, não foi possível compará-las.

Diversos autores, estudando a hidrólise enzimática de soro de leite pela ação da Alcalase, reportaram valores de *GH* inferiores ao do presente trabalho, variando de 16% a 20% (Li-Jun et al., 2008; Perea et al., 1993). Tal fato pode ser devido à etapa de UF do soro de leite realizada anteriormente à hidrólise enzimática. Para verificar o efeito da UF sobre o *GH*, foram realizados ensaios de hidrólise do soro de leite em pó reconstituído que não sofreram UF e com o mesmo conteúdo proteico. Como resultado, observou-se que o máximo *GH* alcançado para as enzimas Alcalase, Flavourzyme e a mistura destas foram 26%, 8,3% e 27%, respectivamente, valores inferiores aos obtidos para o soro concentrado por membranas, demonstrando o efeito da UF sobre o *GH*. Provavelmente, as condições utilizadas na UF (40 °C e 5 bar) podem ter favorecido o desdobramento da proteína, aumentando a sua exposição e, conseqüentemente, sua susceptibilidade à proteólise. Li et al. (2015) reportaram a desnaturação das proteínas do leite quando submetidas à UF, que pode ter ocorrido devido ao estresse mecânico causado pelo processo (Belmejdoub et al., 2012), permitindo maior exposição à ação da enzima (O'Loughlin et al., 2012).

A Figura 2 ilustra o perfil eletroforético dos hidrolisados proteicos. Analisando-se as amostras não hidrolisadas (A1, M1 e F1), observa-se a presença de duas bandas intensamente coradas, que correspondem

às frações β -lactoglobulina (18 kDa) e α -lactoalbumina (14 kDa), proteínas mais abundantes do soro, além de caseínas (26,6 kDa) remanescentes do processo de fabricação do queijo.

Para os hidrolisados obtidos pela Alcalase, observa-se um gradual desaparecimento das bandas proteicas com massa molecular acima de 26 kDa, demonstrando assim que houve a clivagem das caseínas já na primeira hora de ação da enzima. É possível também observar a hidrólise da α -La ao longo da reação. Já a β -Lg parece ser mais resistente à ação da enzima, provavelmente devido à sua organização estrutural secundária e terciária. Observa-se, no entanto, que houve uma hidrólise parcial da mesma, uma vez que a intensidade das bandas diminuiu ao longo do tempo da reação. Como o método detecta cadeias polipeptídicas de até 1,0 kDa, provavelmente não foi possível visualizar os peptídeos gerados, o que sugere extensa hidrólise proteica, com formação de peptídeos de peso molecular inferior a 1 kDa, ou ainda, como a Alcalase é uma enzima de ampla ação e pouca seletividade (Pessato et al., 2016), é possível que tenham sido gerados muitos peptídeos, de diferentes estruturas e massas, não sendo possível a visualização destes pela sua baixa concentração.

A Figura 2b apresenta os resultados para a mistura das enzimas. Observa-se que houve menor degradação das caseínas ao se comparar com os dados da Alcalase (Figura 2a). O mesmo acontece para a hidrólise da α -La e β -Lg, indicando menor hidrólise destas proteínas. Já para o tratamento do soro de leite com a Flavourzyme (Figura 2c), nota-se uma coloração intensa, correspondente às frações proteicas não hidrolisadas de β -Lg (18 kDa) e α -La (14 kDa), e à formação de bandas de peptídeos na faixa de 1 kDa em pequena proporção, comprovando que houve pequena intensidade de hidrólise proteica, inclusive em relação às caseínas, no topo do gel.

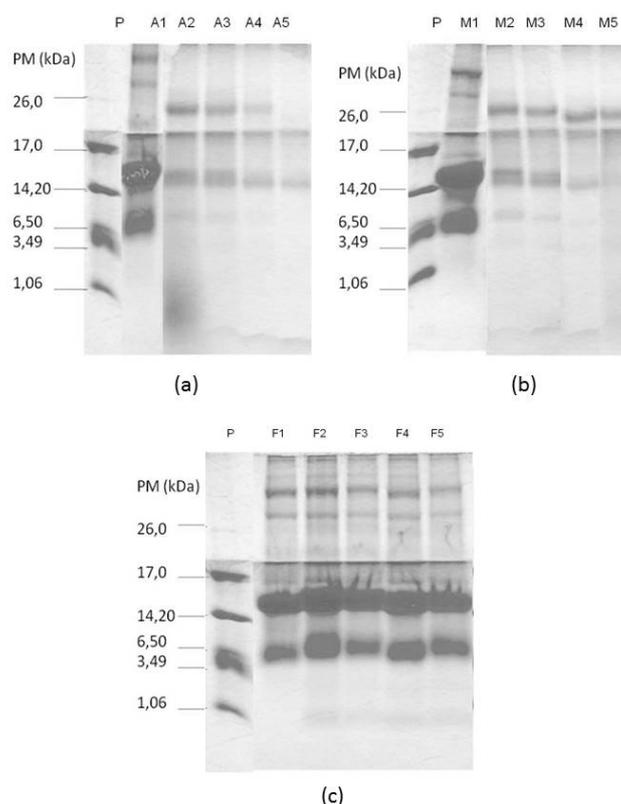


Figura 2. Perfis eletroforéticos de hidrolisados proteicos obtidos pela: (a) Alcalase; (b) mistura Alcalase e Flavourzyme; e (c) Flavourzyme. P é padrão de ultra baixo peso molecular (PM); A1-A5 são referentes aos hidrolisados obtidos pela Alcalase com grau de hidrólise (*GH*) de 0, 15,7, 31,5, 47,2 e 63,0%; F1-F5 são referentes aos hidrolisados obtidos pela Flavourzyme com *GH* de 0, 3,8, 7,7, 11,5 e 15,0%; M1-M5 são referentes aos hidrolisados obtidos pela mistura Alcalase e Flavourzyme com *GH* de 0, 13,0, 26,0, 39,0 e 52,0%; β -Lg e α -La correspondem à β -lactoglobulina e α -lactalbumina.

3.2 Atividade antioxidante

Os resultados de *AA* dos hidrolisados proteicos com diferentes *GH* estão ilustrados na Figura 3. Como esperado, o aumento no *GH* resultou em maior quantidade de peptídeos liberados, observado pelo aumento na concentração de tirosina. Também, para todos os ensaios, verificou-se que maiores valores de *AA* ocorreram em amostras com elevado *GH*. Diversos autores têm reportado o efeito positivo do *GH* na *AA* de soro de leite (Le Maux et al., 2016; Contreras et al., 2011). De acordo com Elias et al. (2008), a *AA* das proteínas pode estar relacionada à composição de aminoácidos. Entretanto, tal propriedade é limitada pela estrutura terciária, uma vez que os aminoácidos antioxidantes estão inacessíveis às substâncias pró-oxidantes. Desta forma, a clivagem das proteínas favorece a exposição de tais aminoácidos, aumentando a *AA*.

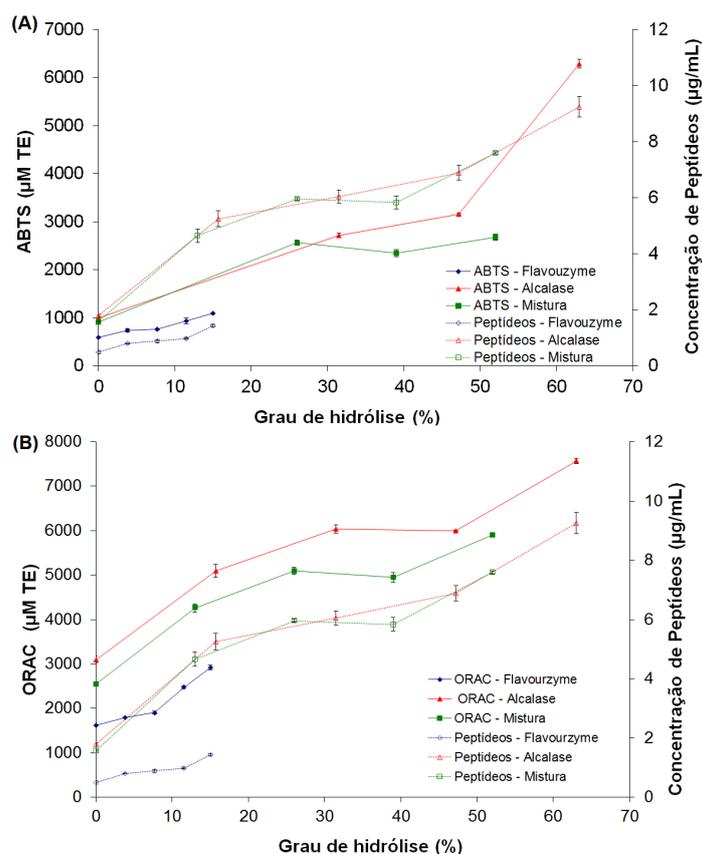


Figura 3. Concentração estimada de peptídeos com base na concentração de tirosina e atividade antioxidante pelos métodos ABTS (A) e ORAC (B) dos hidrolisados proteicos com diferentes graus de hidrólise obtidos pela Alcalase, pela Flavourzyme e pela mistura destas.

Entretanto, comparando os hidrolisados com valores similares de *GH*, as amostras hidrolisadas pela Alcalase apresentaram maiores *AA* que as obtidas pela ação da Flavourzyme e da mistura das enzimas. Estes resultados podem ser devidos à diferença entre os perfis peptídicos formados em cada condição, uma vez que as enzimas possuem diferentes mecanismos de reação e especificidade. Ou seja, tal fato influencia no número e na localização das ligações peptídicas clivadas na hidrólise, resultando na liberação de diferentes peptídeos quanto ao tamanho e à composição de aminoácidos (Polanco-Lugo et al., 2014). A Alcalase atua em sítios específicos no interior da cadeia polipeptídica, sendo responsável pela geração de peptídeos de menor massa molecular (Figura 2a). De acordo com a literatura, quanto menor a massa molecular dos peptídeos, maior a *AA* atribuída ao hidrolisado (Sbroggio et al., 2016; Ranamukhaarachchi et al., 2013; Contreras et al., 2011), explicando assim os resultados encontrados para a Alcalase.

Por outro lado, para um mesmo *GH*, os menores valores de *AA* foram observados para os hidrolisados proteicos obtidos pela ação da Flavourzyme. Como esta é composta por oito diferentes enzimas, tais como amino-, dipeptidil- e endopeptidases (Merz et al., 2015), era esperado obter peptídeos de pequena massa molecular devido à ampla ação destas enzimas. Entretanto, o perfil eletroforético (Figura 2c) revelou pequena clivagem das proteínas do soro de leite, resultando em peptídeos de maior massa molecular em comparação com os hidrolisados obtidos pela Alcalase ou pela mistura Alcalase + Flavourzyme. Assim, pode-se inferir que a efetividade da Flavourzyme na hidrólise das proteínas do soro de leite provavelmente foi devida à ação das amino- e dipeptidilpeptidases, resultando em peptídeos com maior massa molecular e, conseqüentemente, menor *AA*.

Com relação aos hidrolisados proteicos obtidos pela ação da mistura das enzimas, eram esperados resultados mais expressivos, uma vez que a ação combinada de enzimas com diferentes ações catalíticas resultaria em peptídeos de baixa massa molecular e, conseqüentemente, maior *AA*. Entretanto, como mostram os resultados do presente trabalho, esta hipótese não se confirmou. Tal fato pode estar relacionado à diminuição da quantidade de Alcalase na mistura enzimática, quando comparada com o uso dela pura, devido à adição da Flavourzyme, na proporção 50:50.

Analisando-se a Figura 3, as amostras apresentaram maior capacidade em sequestrar o radical peroxil (ORAC) do que o radical livre ABTS⁺. Tais resultados são devidos aos mecanismos distintos dos métodos utilizados: o ORAC é baseado na transferência de átomos de hidrogênio, enquanto que o ABTS, na transferência de elétrons (Sarmadi & Ismail, 2010). Hernández-Ledesma et al. (2005) verificaram que aminoácidos aromáticos presentes no leite, tais como triptofano e tirosina, têm habilidade de agir como doadores de hidrogênio. Este mecanismo é responsável pela atividade antioxidante desses aminoácidos, justificando assim o fato de o método ORAC apresentar melhores resultados quando comparado com o método ABTS. Além disso, os resultados obtidos são promissores, uma vez que o método ORAC possui um significado biológico maior em relação àqueles que utilizam oxidantes que não são necessariamente pró-oxidantes fisiológicos, como, por exemplo, o radical ABTS⁺ (Lima, 2008). De acordo com Lima (2008), o radical peroxila é a espécie reativa de oxigênio biologicamente mais importante por sua abundância e por ser responsável por danos oxidativos.

3.3 Atividade antimicrobiana

Não foi verificada atividade antimicrobiana das amostras contra as cepas bacterianas estudadas. Deve-se levar em consideração que, diferentemente do presente trabalho, diversos estudos são realizados a partir de frações purificadas (Osman et al., 2016; Théolier et al., 2013) ou concentradas (Demers-Mathieu et al., 2013). Dessa forma, uma possível explicação para que os hidrolisados obtidos neste trabalho não apresentassem atividade antimicrobiana é a baixa concentração de proteínas usada na análise. Também, tais resultados podem ser devidos ao tamanho dos peptídeos obtidos. De acordo com Salami et al. (2010), acredita-se que peptídeos de tamanhos menores (entre 2 e 20 aminoácidos) ultrapassem a membrana celular da bactéria mais facilmente, apresentando maior atividade antimicrobiana.

4 Conclusões

O uso de enzimas com diferentes especificidades resultou em hidrolisados com diferentes *AA*. O hidrolisado obtido pela Alcalase apresentou maiores *AA* em relação às outras amostras. Foi verificado que o aumento no *GH* favoreceu a liberação de peptídeos antioxidantes. Todas as amostras apresentaram maior capacidade de capturar o radical peroxila, um pró-oxidante fisiológico, do que o radical ABTS⁺. A diferença nos resultados provavelmente se deve à ação catalítica das enzimas, que atuam em diferentes pontos da estrutura proteica para clivagem das ligações peptídicas. Entretanto, nenhum hidrolisado proteico apresentou atividade antimicrobiana contra cepas de *S. choleraesuis* subsp. *Enteritidis CT* e *L. monocytogenes*. Este

estudo demonstrou que a hidrólise enzimática proteica do soro de leite previamente concentrado por membranas resulta na obtenção de hidrolisados com diferentes perfis peptídicos e propriedades antioxidantes.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores agradecem à Fundação Carlos Chagas Filho de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo auxílio financeiro (Processo n.º E-26/110.708/2011).

Referências

- Adler-Nissen, J. (1985). *Enzymic hydrolysis of food protein*. London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Antunes, A. J. (2003). *Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino* (135 p.). São Paulo: Manole.
- Bamdad, F., Wu, J., & Chen, L. (2011). Effect of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. *Journal of Cereal Science*, 54(1), 20-28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2011.01.006>
- Belmejdoub, J., Rabiller-Baudry, M., Delaunay, D., & Gésan-Guiziu, G. (2012). Structural modifications of globular proteins in a ultrafiltration loop as evidenced by intrinsic fluorescence and reverse-phase liquid chromatography. *Separation and Purification Technology*, 96, 274-288. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2012.06.010>
- Benkerroum, N. (2010). Antimicrobial peptides generated from milk proteins: A survey and prospects for application in the food industry: A review. *International Journal of Dairy Technology*, 63(3), 320-338. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00584.x>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. PMID:942051. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brandelli, A., Daroit, D. J., & Corrêa, A. P. F. (2015). Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International*, 73, 149-161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.016>
- Chang-Lee, M. V., Pacheco-Aguilar, R., Crawford, D. L., & Lampila, L. E. (1989). Proteolytic activity of surimi from Pacific Whiting (*Merluccius productus*) and heat-set gel texture. *Journal of Food Science*, 54(5), 1116-1119. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb05935.x>
- Contreras, M. M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P. J., & Recio, I. (2011). Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie*, 44(1), 9-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.017>
- Demers-Mathieu, V., Gauthier, S. F., Britten, M., Fliss, I., Robitaille, G., & Jean, J. (2013). Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration. *International Dairy Journal*, 28(2), 94-101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.09.003>
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430-441. PMID:18464032. <http://dx.doi.org/10.1080/10408390701425615>
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., & Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 1841-1856. PMID:15686406. <http://dx.doi.org/10.1021/jf048626m>
- Kim, S. B., Seo, I. S., Khan, M. A., Ki, K. S., Nam, M. S., & Kim, H. S. (2007). Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. *International Dairy Journal*, 17(6), 625-631. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.09.001>
- Koutinas, A. A., Athanasiadis, I., Bekatorou, A., Psarianos, C., Kanellaki, M., Agouridis, N., & Blekas, G. (2007). Kefir yeast technology: Industrial scale up of alcoholic fermentation of whey, promoted by raisin extracts, using kefir-yeast granular biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(5), 576-582. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.05.013>
- Le Maux, S., Nongonierma, A. B., Barre, C., & FitzGerald, R. J. (2016). Enzymatic generation of whey protein hydrolysates under pH-controlled and non pH-controlled conditions: Impact on physicochemical and bioactive properties. *Food Chemistry*, 199, 246-251. PMID:26775967. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.021>
- Li, Y., Dalgleish, D., & Corredig, M. (2015). Influence of heating treatment and membrane concentration on the formation of soluble aggregates. *Food Research International*, 76(Pt 3), 309-316. PMID:28455009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.016>
- Li-Jun, L., Chuan-He, Z., & Zheng, Z. (2008). Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. *Food and Bioprocess Technology*, 86(1), 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2007.10.007>
- Lima, A. (2008). *Caracterização química, avaliação antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (Caryocar brasiliense, Camb.)* (Tese de doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Merz, M., Eisele, T., Berends, P., Appel, D., Rabe, S., Blank, I., Stressler, T., & Fischer, L. (2015). Flavourzyme, an enzyme preparation with industrial relevance: Automated nine-step purification and partial characterization of eight enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(23), 5682-5693. PMID:25996918. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01665>

- Morais, H. A., Silvestre, M. P. C., Silva, M. R., Silva, V. D. M., Batista, M. A., Simões e Silva, A. C., & Silveira, J. N. (2015). Enzymatic hydrolysis of whey protein concentrate: Effect of enzyme type and enzyme: substrate ratio on peptide profile. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 201-210. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-013-1005-z>
- Mutilangi, W. A. M., Panyam, D., & Kilara, A. (1995). Hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey proteins. *Journal of Food Science*, 60(5), 1104-1109. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb06302.x>
- Nchienzia, H. A., Morawicki, R. O., & Gadang, V. P. (2010). Enzymatic hydrolysis of poultry meal with endo- and exopeptidases. *Poultry Science*, 89(10), 2273-2280. PMID:20852119. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2008-00558>
- O'Loughlin, B., Murray, B. A., Kelly, P. M., Fitzgerald, R. J., & Brodtkorb, A. (2012). Enzymatic hydrolysis of heat-induced aggregates of whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(19), 4895-4904. PMID:22533541. <http://dx.doi.org/10.1021/jf205213n>
- Osman, A., Goda, H. A., Abdel-Hamid, M., Badran, S. M., & Otte, J. (2016). Antibacterial peptides generated by Alcalase hydrolysis of goat whey. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie*, 65, 480-486. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.043>
- Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J. (2002). Utilisation of chickpea protein isolate for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(9), 960-965. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1126>
- Perea, A., Ugalde, U., Rodriguez, I., & Serra, J. L. (1993). Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: Applications in industrial bioconversion processes. *Enzyme and Microbial Technology*, 15(5), 418-423. PMID:7763629. [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90129-P](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(93)90129-P)
- Pessato, T. B., Carvalho, N. C., Tavano, O. L., Fernandes, L. G. R., Zollner, R. L., & Netto, F. M. (2016). Whey protein isolate hydrolysates obtained with free and immobilized Alcalase: Characterization and detection of residual allergens. *Food Research International*, 83, 112-120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.015>
- Polanco-Lugo, E., Dávila-Ortiz, G., Betancur-Ancona, D. A., & Chel-Guerrero, L. A. (2014). Effects of sequential enzymatic hydrolysis on structural, bioactive and functional properties of *Phaseolus lunatus* protein isolate. *Food Science and Technology*, 34(3), 441-448. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.6349>
- Ranamukhaarachchi, S., Meissner, L., & Moresoli, C. (2013). Production of antioxidant soy proteins hydrolysates by sequential ultrafiltration and nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, 429, 81-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2012.10.040>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. PMID:10381194. [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Salami, M., Moosavi-Movahedi, A. A., Ehsani, M. R., Yousefi, R., Haertle, T., Chobert, J. M., Razavi, S. H., Henrich, R., Balalaie, S., Ebadi, S. A., Pourtakdoost, S., & Niasari-Naslaji, A. (2010). Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3297-3302. PMID:20175528. <http://dx.doi.org/10.1021/jf9033283>
- Samaranayaka, A. G. P., & Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 229-254. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2011.05.006>
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956. PMID:20600423. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>
- Sbroggio, M. F., Montilha, M. S., Figueiredo, V. R. G., Georgetti, S. R., & Kurozawa, L. E. (2016). Influence of degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Science and Technology (Campinas)*, 36(2), 375-381. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.000216>
- Schägger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368-379. PMID:2449095. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Théolier, J., Hammami, R., Labelle, P., Fliss, I., & Jean, J. (2013). Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 706-714. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2013.01.014>
- Vioque, J., Pedroche, J., Yust, M. M., Lqari, H., Megías, C., Girón-calle, J., Alaiz, M., & Millán, F. (2006). Peptídeos bioativos em proteínas vegetais de reserva. *Brazilian Journal of Food Technology*, 16, 99-102.
- Wan, J., Wilcock, A., & Coventry, M. J. (1998). The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(2), 152-158. PMID:9633630. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00338.x>

Financiamento: FAPERJ (nº E-26/110.708/2011) e CAPES (Código de Financiamento 001).

Received: Jan. 25, 2018; Accepted: Oct. 24, 2018