

## UTILIZAÇÃO DO SORO DE LEITE VISANDO REDUZIR A POLUIÇÃO AMBIENTAL: HIDRÓLISE PELA PANCREATINA

Wendel de Oliveira Afonso, Eliza Augusta Rolim Biasutti, Vinícius de Moro Castro, Viviane Dias Medeiros Silva, Marialice Pinto Coelho Silvestre\*

\*e-mail: [malice@farmacia.ufmg.br](mailto:malice@farmacia.ufmg.br)

Recebido em 30 de junho de 2008.

Aceito em 26 de agosto de 2008.

### RESUMO

Visando o aproveitamento de um subproduto industrial e contribuir, assim, para reduzir a poluição ambiental, este trabalho teve como objetivo a obtenção de hidrolisados protéicos com elevado teor de di-tripeptídeos, a partir do soro de leite. Para tal, empregou-se a pancreatina e diferentes condições hidrolíticas foram testadas. Avaliaram-se o tempo de hidrólise (5, 10 e 15 h), a relação enzima:substrato (E:S) (1:100, 2:100 e 4:100) e a concentração da matéria-prima (10 e 15 %). Caracterizou-se o perfil peptídico pelo fracionamento dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular e, para a quantificação dos componentes das frações cromatográficas, empregou-se o método rápido da Área Corrigida da Fração. Para os parâmetros estudados, observaram-se efeitos variados da pancreatina sobre o perfil peptídico dos hidrolisados sendo que, sob o ponto de vista nutricional, nove hidrolisados apresentaram resultados semelhantes, ou seja, altos teores de di-tripeptídeos (12,11%, em média) e de aminoácidos livres (49,06 %, em média), quando comparados ao hidrolisado protéico de soro comercial.

**Palavras-chave:** Subproduto industrial. Poluição ambiental. Soro de leite. Hidrólise protéica. Pancreatina, di-tripeptídeos.

### 1 INTRODUÇÃO

Soro de leite (ou também como comumente denominado Soro de Queijo) é o líquido remanescente após a precipitação e remoção da caseína, principal proteína do leite [1,2]. Representa cerca de 85-90% do volume e 55% dos nutrientes do leite [2].

O Brasil produz anualmente cerca de 600 mil toneladas de queijo, gerando, aproximadamente, 4 bilhões de litros de soro, sendo que a maior parte deste subproduto é despejada em cursos de águas, poluindo o meio ambiente. Estes números demonstram o impacto ambiental que esta prática impõe sobre a reserva hídrica nacional e comprovam o interesse em transformar o soro em matéria-prima de alto valor agregado [3].

Diversas aplicações industriais para o soro do leite já estão bem definidas, a mais usada é na indústria de laticínios, como, por exemplo, na produção de ricota e inúmeras bebidas lácteas. Além disso, é extensamente utilizado como coadjuvante tecnológico e/ou ingrediente na indústria de produtos cárneos, panificação e confeitaria [4].

Por outro lado, a despeito de todas as possíveis aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica, no Brasil o soro ainda é considerado como um rejeito de baixo ou nenhum valor comercial, subproduto da fabricação de queijo, sendo utilizado na alimentação de animais ou descartado em efluentes sem qualquer tratamento. O soro em si não é poluente, mas quando lançado no curso d'água constitui-se em um forte agente de

poluição ambiental devido a sua alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), associada,

principalmente, à presença de lactose e proteínas. A industrialização do soro é uma área incipiente no Brasil, com pouca tecnologia desenvolvida para agregação de valor ao mesmo. Apesar de o país ser um grande produtor de queijos e, conseqüentemente, de soro, grande parte deste componente lácteo utilizado no Brasil é importado, assim como seus derivados com maior valor agregado, como, por exemplo, hidrolisados protéicos, concentrados e isolados protéicos [2,5]. Por estas razões, é de grande interesse criar opções para utilização do soro do leite e o presente trabalho representa mais uma contribuição neste sentido.

Um dos caminhos que podem ser seguidos para o aproveitamento do soro de leite, constitui o emprego da hidrólise enzimática de proteínas, uma vez que este processo é capaz de contribuir para a melhoria das propriedades físicas, químicas, funcionais, organolépticas e nutricionais destes nutrientes, atuando, particularmente, nas características de absorção. Diversos autores têm demonstrado que formulações contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente de di-tripeptídeos, e de aminoácidos livres, provenientes da hidrólise enzimática de proteínas, são utilizadas mais efetivamente do que a proteína intacta ou uma mistura equivalente de aminoácidos livres, apresentando, assim, um maior valor nutritivo [6-10].

Os hidrolisados protéicos, originados deste tratamento enzimático, vêm sendo utilizados com

finalidades terapêuticas para a manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir normalmente as proteínas. Ao longo dos últimos anos, esta utilização manifestou expressivo crescimento, tanto por seus aspectos nutricionais e clínicos, como pela melhoria das propriedades funcionais das proteínas [11]. Os hidrolisados protéicos são produtos destinados, primeiramente, para uso nutricional de indivíduos que apresentam necessidades nutricionais e/ou fisiológicas não cobertas pela alimentação convencional [12,13].

A qualidade e as características finais do hidrolisado protéico dependem de vários fatores, que devem ser controlados para se alcançar os resultados desejados, entre eles encontram-se a natureza e associação de enzimas, pH, temperatura, tempo de hidrólise, tipo e concentração de matéria-prima, relação enzima:substrato e inativação enzimática ao final do processo [11,14-18]. Ainda, o valor nutricional do produto dependerá de 3 fatores essenciais: da proteína de origem, do modo de hidrólise e do tamanho dos peptídeos formados na hidrólise [19].

Para o presente trabalho, a enzima hidrolítica de escolha foi a pancreatina, um complexo enzimático constituído por enzimas secretadas pelo pâncreas as quais possuem atividades proteolíticas, amilolíticas e lipolíticas [20]. Estas proteases pancreáticas são divididas em endopeptidases (tripsina, quimotripsina e elastase) e exopeptidases (carboxipeptidases A e B) [21].

O concentrado de proteínas do soro de leite (WPC - Whey Protein Concentrate), produto originado da separação em membranas das proteínas do soro de leite, é a matéria-prima do presente trabalho e contém de 35 a 80 % de proteínas, enquanto o isolado protéico do soro, WPI, possui de 80 a 95 % de proteínas. Várias aplicações importantes estão associadas ao WPC, sendo um ingrediente amplamente utilizado na indústria de alimentos em uma grande variedade de produtos como cárneos, bebidas, produtos de padaria e formulações infantis, devido às excelentes propriedades funcionais destas proteínas [22,23].

A avaliação da qualidade dos hidrolisados protéicos envolve a determinação dos teores de peptídeos obtidos durante o processo hidrolítico. Desta forma, várias técnicas cromatográficas têm sido descritas na literatura, mas estas apresentam inúmeros inconvenientes, tais como interações entre o soluto e a fase estacionária e a ineficiência em separar os pequenos peptídeos [24-28].

Neste sentido, Silvestre *et al.* [17] desenvolveram um método eficiente para fracionamento e quantificação dos peptídeos, empregando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli (2-hidroxi-etil-aspartamido)-sílica (PHEA), que lhes possibilitou separar peptídeos com massas

moleculares menores do que 1000 Da, sendo este método empregado no presente estudo.

Este trabalho teve como objetivo utilizar a hidrólise protéica, empregando-se uma pancreatina, como forma de aproveitamento do soro de leite. Para tal, as condições hidrolíticas foram otimizadas a fim de se obter hidrolisados protéicos com elevado teor de di-tripeptídeos e aminoácidos livres.

## 2 PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Material

O concentrado protéico do soro de leite em pó (Kerrylac 750) foi doado pela Kerry do Brasil Ltda (Três Corações, MG, Brasil). A enzima pancreatina (Corolase PP), fornecida pela AB Enzymes® (Barueri, SP, Brasil), é uma enzima mista, de origem animal (pâncreas suíno), atividade 2000.000 LVE/g, estável em pH neutro ou ligeiramente alcalino, pH ótimo entre 7 e 9 com temperatura ótima entre 35-50 °C.

Um agitador magnético (Fisatom, modelo 752A) com temperatura controlada e agitação constante foi utilizado para homogeneizar a mistura. Um liofilizador (Freeze Dry System/FreeZone 4,5, model 77500, LABCONCO, Kansas City, MO, EUA) foi usado para desidratar as amostras. O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usado no fracionamento dos hidrolisados protéicos era constituído por uma coluna cromatográfica PHEA [poli-(2-hidroxi-etil-aspartamida)-sílica], 250 x 9,4 mm, 5 µm e 200 Å (PolyLC, Columbia, MD, EUA), uma bomba isocrática e um detector espectrofotométrico UV-VIS (série HP 1100, Waldbronn, Alemanha), acoplado a um computador com software (HPchemstation, Avondale, EUA). A água usada no cromatógrafo foi purificada em Sistema de Purificação (Áries Vaponics, Rockland, USA).

### 2.2 Determinação da composição química do concentrado protéico do soro de leite

A composição química do concentrado protéico do soro de leite (WPC) foi determinada segundo os métodos descritos na AOAC [29]. A umidade foi determinada pelo método de secagem em estufa ventilada (Quimis Q-314M242, série 020, Diadema, SP) a 105 °C até peso constante; as cinzas, por incineração, em mufla a 550 °C; os lipídeos, por extração com éter etílico (Soxhlet modificado, Quimis Q-308G26, série 018, Diadema, SP); as proteínas foram determinadas pelo método de micro-Kjeldahl e a lactose por determinação de glicídios redutores em lactose. O fator de conversão de nitrogênio para proteína usado foi 6,38 [30].

### 2.3 Preparo dos hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite

Foram preparados 18 hidrolisados enzimáticos utilizando-se a pancreatina. As soluções a 10 % e 15 % (p/v) de concentrado protéico do soro de leite tiveram seu pH ajustado para 7,0 com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a  $3 \text{ mol L}^{-1}$  e foram colocadas em banho de óleo a  $50^\circ\text{C}$ , sob agitação contínua.

A enzima foi, então, adicionada em quantidade suficiente para se obter a relação enzima:substrato (E:S) desejada. Após 5, 10 e 15 h de hidrólise, a reação foi interrompida por meio do aumento da temperatura para  $85^\circ\text{C}$  por 20 min. Os hidrolisados obtidos foram liofilizados. Algumas condições de hidrólise estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Variáveis hidrolíticas empregadas no preparo de hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite

Hidrolisados	Concentração da Matéria-prima (p/v)	E:S	Tempo de hidrólise (h)
P1	10	1:100	5
P2	10	2:100	5
P3	10	4:100	5
P4	10	1:100	10
P5	10	2:100	10
P6	10	4:100	10
P7	10	1:100	15
P8	10	2:100	15
P9	10	4:100	15
P10	15	1:100	5
P11	15	2:100	5
P12	15	4:100	5
P13	15	1:100	10
P14	15	2:100	10
P15	15	4:100	10
P16	15	1:100	15
P17	15	2:100	15
P18	15	4:100	15

E:S = relação enzima substrato

### 2.4 Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite

Esta caracterização 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 (SE-HPLC) em coluna PHEA, conforme descrito por Silvestre *et al.* [17]. As amostras foram dissolvidas em uma concentração de 1 g % (p/v) na fase móvel (ácido fórmico a 0,05 mol/L, pH 2,5) e submetidas à

cromatografia à temperatura ambiente, sob condições isocráticas, a um fluxo de 0,5 mL/min, durante 35 min, sendo que o volume injetado foi de 20  $\mu\text{L}$ . A fase móvel foi filtrada, através de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ , e desgaseificada imediatamente antes do uso. As frações foram separadas de acordo com o tempo de eluição, sendo F1 de 11,5 a 16,0 min (grandes peptídeos, com mais de 7 resíduos de aminoácidos); F2 de 16,0 a 19,5 min (peptídeos médios, entre 4 e 7 resíduos); F3 de 19,5 a 20,5 min (di- e tripeptídeos); e F4, de 20,5 a 32,0 min (aminoácidos livres).

O método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF), desenvolvido por Silvestre *et al.* [18], foi utilizado para quantificar os peptídeos e aminoácidos livres presentes nos hidrolisados do soro de leite. Neste método, resumidamente, foram preparados cinco hidrolisados padrão (dois com tripsina e três com pancreatina) que foram fracionados por HPLC de exclusão molecular em coluna PHEA. As quatro frações obtidas foram coletadas (Coletor de Frações, modelo CF-1, Spectrum/Chrom, Houston, TX, EUA) sendo que o solvente foi removido, de cada fração, em evaporador Centrivap (modelo 78100-00D, Labconco, Kansas City, MI, EUA). Posteriormente, as frações foram submetidas à análise de aminoácidos. O cálculo da ACF foi realizado por meio de fórmulas desenvolvidas por Silvestre *et al.* [18], 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 padrão, plotando-se ACF em função do teor de aminoácidos [18,31-39].

### 2.5 Análise estatística

Todos os experimentos foram feitos em 3 repetições e as análises realizadas em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância e para a avaliação das diferenças entre as médias dos teores de peptídeos e aminoácidos livres das frações cromatográficas dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite foi utilizado o Teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ) [40].

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Composição química do concentrado protéico do soro de leite

Observa-se na Tabela 2 que os teores obtidos para proteínas, cinzas totais e lactose estão próximos aos encontrados por outros autores.

Além disso, o teor de umidade está de acordo com a ficha técnica do produto que informa apenas sobre este valor ( $> 5 \text{ g } \%$ ), porém é bem superior aos obtidos pelos outros autores. Por outro

lado, a quantidade de lípidos aqui encontrada é muito menor do que a reportada na literatura.

Estas diferenças devem estar relacionadas, principalmente, às variações da matéria-prima utilizada bem como aos processos industriais de obtenção do WPC.

Tabela 2- Composição química do concentrado protéico do soro de leite

Componentes	Valores obtidos (g %)	WPC 1 (g %)	WPC 2 (g %)	WPC 3 (g %)
Proteínas	35,8	---	34,5	38,6
Umidade	8,38	> 5	3,5	2,4
Lipídeos	0,05	---	3,5	2,8
Cinzas totais	5,30	---	6,4	6,5
Lactose	50,18	---	52,1	49,8

<sup>1</sup>Valores encontrados após análise do concentrado protéico do soro de leite utilizado no experimento (KERRYLAC 750, Kerry do Brasil Ltda, MG, Brasil). WPC 1 - Valores disponibilizados na ficha técnica do produto KERRYLAC 750 da Kerry do Brasil Ltda (Três Corações, MG, Brasil); WPC 2 - Valores encontrados por Sammel e Claus [41] analisando o WPC Foremost 365 (Foremost Farms, Baraboo, WI, USA). WPC 3 - Valores encontrados por MORTENSON *et al.* [42].

### 3.2 Caracterização dos hidrolisados do concentrado protéico do soro de leite

#### 3.2.1 Perfil peptídico dos hidrolisados protéicos

Em diversos trabalhos realizados no mesmo laboratório do presente estudo, conforme descrito anteriormente, os hidrolisados protéicos foram separados em quatro frações (F1, F2, F3 e F4) [17,31,32,34-39]. A fração F1 corresponde aos peptídeos com mais de 7 resíduos de aminoácidos, a fração F2 aos peptídeos médios contendo de 4 a 7 resíduos de aminoácidos, a fração F3 contém os di- e tripeptídeos e a fração F4 os aminoácidos livres. A título de exemplo, o perfil cromatográfico do hidrolisado P1, a 230 nm, está apresentado na Figura 1.

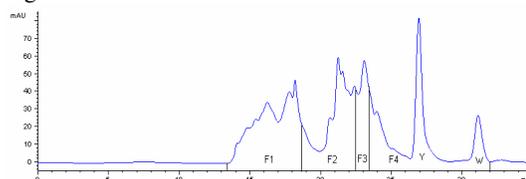


Figura 1: Perfil cromatográfico do hidrolisado P1 a 230 nm. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Y = pico da tirosina, W = pico do triptofano. Hidrolisado P1= matéria-prima a 10%; tempo de hidrólise = 5h; relação E:S = 1%.

A técnica de SE-HPLC, utilizada no presente trabalho, foi eficiente para caracterização

de hidrolisados protéicos, especialmente quando o interesse está voltado para o fracionamento de peptídeos com massas moleculares pequenas, ou seja, inferiores a 1000 Da. Estas observações confirmam, mais uma vez, os resultados obtidos no mesmo laboratório do presente estudo, para o fracionamento e a quantificação de hidrolisados de proteínas utilizando o soro de leite [36,37,39,43] e outras fontes protéicas como caseína [31-33,35], leite [34,38] e arroz [44].

A avaliação das publicações disponíveis na literatura científica mostra diversas técnicas para o fracionamento dos peptídeos de hidrolisados protéicos, como por exemplo, eletroforese em gel de poliacrilamida-sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE) [25,45,46], cromatografia de exclusão molecular (SEC) [47], HPLC capilar [26], HPLC de troca de iônica (AE-HPLC) [48] e HPLC de exclusão molecular (SE-HPLC) empregando coluna TSK G-2000 SW (6 x 7,5 cm) [24] e coluna Superose -12HR 10/30 [27,28].

Contudo, ao contrário da técnica aqui utilizada, a maioria destes métodos apresenta uma série de inconvenientes. Assim, Lemieux *et al.* [24], empregando a SE-HPLC com uma coluna TSK G-2000 SW, e Davis e Lee [26], empregando a HPLC capilar, relataram a dificuldade de separar os peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, tendo observado uma superposição de compostos com pesos moleculares diferentes.

Visser *et al.* [28] e Golovchenko *et al.* [27], também utilizando SE-HPLC, porém com uma coluna Superose -12HR 10/30, verificaram a ocorrência de interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas entre os solutos e a fase estacionária. Schimidt e Poll [25], empregando a SDS-PAGE, relataram a dificuldade de detectar pequenos peptídeos (< 2000 Da) pela técnica utilizada, uma vez que os peptídeos, devido à fixação insuficiente, são removidos durante os procedimentos de revelação e lavagem do gel.

Dois métodos cromatográficos (exclusão molecular em coluna Sephadex G25 e cromatografia líquida de alta velocidade com eletro spray acoplado ao espectrômetro de massa) foram empregados por Li-Jun *et al.* [49], para avaliar a distribuição de tamanho molecular de peptídeos obtidos de soro de leite pela ação de uma protease alcalina (alcalase). Entretanto, estes métodos não foram capazes de fracionar os peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, especialmente os pequenos peptídeos. Segundo os autores, apenas a faixa de peso molecular foi evidenciada, indo de 600 a 1400 Da e de 300 a 1300 Da, para o primeiro e o segundo método, respectivamente.

Saint-Sauveur *et al.* [50] avaliaram as propriedades imunomoduladoras de peptídeos obtidos da hidrólise das proteínas isoladas do soro de leite com uso de tripsina e quimotripsina. Entretanto, o método analítico utilizado por estes

autores para caracterizar o perfil peptídico (fracionamento por Foco Isoelétrico em Fase Líquida e quantificação por Cromatografia Líquida de Exclusão Molecular) separa os peptídeos obtidos nas seguintes frações; maiores que 10 kDa, entre 5 e 10 kDa, entre 2 e 5 kDa e menores que 2 kDa, não sendo eficiente para avaliação do conteúdo de di-tripeptídeos.

### 3.2.1 Teores de peptídeos e de aminoácidos livres dos hidrolisados

Na Tabela 3, observa-se que não houve diferença no perfil peptídico de alguns hidrolisados uma vez que os valores obtidos para todas as frações foram estatisticamente iguais. Este é o resultado obtido quando se compara P2 com P11; P4 com P6 e com P12; P17 com P18.

Para a escolha do hidrolisado que apresentou o melhor perfil peptídico, do ponto de vista nutricional, as ponderações de alguns autores devem ser consideradas. Assim, segundo Frenhani e Burini [9], durante o metabolismo de proteínas, o primeiro estágio de hidrólise leva à formação de oligopeptídeos contendo de 2 a 6 resíduos de aminoácidos e aminoácidos livres. Estes peptídeos são, então, quebrados em di-tripeptídeos e, finalmente, as proteínas são absorvidas na forma de di-tripeptídeos e de aminoácidos livres. Ainda, de

acordo com estes mesmos autores os di-tripeptídeos são mais eficientemente absorvidos que os aminoácidos livres, os quais por sua vez o são melhor que os tetra- ou peptídeos superiores. Em quantidades equivalentes de di-tripeptídeos e misturas de aminoácidos livres, os di-tripeptídeos apresentam velocidade de absorção aproximadamente 10 vezes maior. González-Tello *et al.* [51] também relataram as vantagens dos di-tripeptídeos sobre os aminoácidos livres por apresentarem maior velocidade de absorção.

Assim, conclui-se que, do ponto de vista nutricional, nove hidrolisados apresentaram os melhores perfis peptídicos (P2, P4, P5, P6, P11, P12, P15 P17 e P18), com baixos teores de grandes peptídeos (12,80 %, em média), assim como altos teores de di-tripeptídeos (12,11 %, em média) e de aminoácidos livres (49,06 % em média), quando comparados ao hidrolisado de WPC comercial o qual apresenta teores de grandes peptídeos de 39,01 %, di-tripeptídeos 5,90 % e aminoácidos livres 13,95 %.

Uma vez que não foram encontrados na literatura dados de outros autores utilizando a pancreatina para a hidrólise das proteínas do leite ou soro de leite, os resultados do presente trabalho foram comparados somente com os obtidos no mesmo laboratório.

Tabela 3 – Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados de soro de leite obtidos pela ação da pancreatina

Hidrolisados	F1 (> 7)	F2 (4-6)	F3 (2-3)	F4 (AA Livres)
Comercial	39,01 <sup>f/1</sup>	41,16 <sup>a/1</sup>	5,90 <sup>def/4</sup>	13,95 <sup>k/3</sup>
P1	18,02 <sup>i/3</sup>	29,06 <sup>b/2</sup>	8,16 <sup>c/4</sup>	44,75 <sup>ef/1</sup>
P2	14,55 <sup>jkL/3</sup>	29,38 <sup>b/2</sup>	12,13 <sup>ab/4</sup>	43,92 <sup>f/1</sup>
P3	45,37 <sup>e/1</sup>	21,79 <sup>e/3</sup>	6,34 <sup>cde/4</sup>	26,48 <sup>h/2</sup>
P4	13,13 <sup>kLm/3</sup>	28,23 <sup>b/2</sup>	12,12 <sup>ab/3</sup>	46,5 <sup>cde/1</sup>
P5	12,64 <sup>Lmn/3</sup>	16,96 <sup>f/2</sup>	11,36 <sup>b/3</sup>	59,02 <sup>a/1</sup>
P6	11,29 <sup>mn/4</sup>	29,46 <sup>b/2</sup>	13,71 <sup>a/3</sup>	45,52 <sup>def/1</sup>
P7	71,41 <sup>a/1</sup>	19,03 <sup>f/2</sup>	3,35 <sup>g/4</sup>	6,19 <sup>L/3</sup>
P8	59,77 <sup>e/1</sup>	17,46 <sup>f/2</sup>	4,45 <sup>efg/4</sup>	18,3 <sup>J/2</sup>
P9	51,93 <sup>d/1</sup>	18,02 <sup>f/3</sup>	4,45 <sup>efg/4</sup>	25,58 <sup>hi/2</sup>
P10	68,67 <sup>b/1</sup>	17,13 <sup>f/2</sup>	3,88 <sup>fg/4</sup>	10,3 <sup>k/3</sup>
P11	16,34 <sup>ij/3</sup>	27,96 <sup>b/2</sup>	11,61 <sup>ab/4</sup>	44,07 <sup>f/1</sup>
P12	12,34 <sup>mn/3</sup>	27,37 <sup>bc/2</sup>	13,00 <sup>ab/3</sup>	47,26 <sup>cd/1</sup>
P13	45,98 <sup>e/1</sup>	24,29 <sup>d/2</sup>	5,61 <sup>def/4</sup>	24,1 <sup>i/2</sup>
P14	20,92 <sup>h/3</sup>	27,29 <sup>bc/2</sup>	7,12 <sup>cd/4</sup>	44,64 <sup>ef/1</sup>
P15	15,01 <sup>jk/3</sup>	25,64 <sup>cd/2</sup>	11,04 <sup>b/4</sup>	48,29 <sup>c/1</sup>
P16	27,08 <sup>g/2</sup>	29,01 <sup>b/2</sup>	6,79 <sup>cd/4</sup>	37,1 <sup>g/1</sup>
P17	10,71 <sup>no/3</sup>	24,66 <sup>d/2</sup>	11,99 <sup>ab/3</sup>	52,62 <sup>b/1</sup>
P18	9,22 <sup>o/4</sup>	24,38 <sup>d/2</sup>	12,05 <sup>ab/3</sup>	54,33 <sup>b/1</sup>

Todos os valores são apresentados em % nmols das quatro frações. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de significância na comparação de diferentes frações de um mesmo hidrolisado (linha). Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de significância na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados (coluna).

Assim, Biasutti *et al.* [43], utilizando a mesma pancreatina para hidrolisar as proteínas do soro de leite em pó, apesar de terem encontrado um teor de di-tripeptídeos semelhante (12,42 %), o conteúdo de aminoácidos livres foi muito inferior (22,02 %) e o de grandes peptídeos muito maior (28,93 %) que o obtido.

Delvivo *et al.* [36], após a ação de outra pancreatina (Sigma, P-1500), passaram os hidrolisados do soro de leite através de uma coluna de carvão ativado e por uma membrana de ultrafiltração (UF) (corte 10000 Da) caracterizando, posteriormente, o perfil peptídico do produto. Os resultados obtidos foram mais vantajosos que os do presente trabalho apenas com relação aos teores de di-tripeptídeos (21,00 %). Entretanto, foram inferiores por apresentar maiores teores de grandes peptídeos (16,00 %) e menores de aminoácidos livres (23,00 %). A maior concentração de di-tripeptídeos pode ser explicada pela utilização da ultrafiltração, a qual concentra o produto na fração de menor peso molecular. Observa-se, ainda, que outro inconveniente deste estudo refere-se à concentração de matéria-prima utilizada, a qual foi cerca de 10 vezes menor (1,06 %) do que a empregada no presente trabalho, o que elevaria em demasia os custos do processo em larga escala.

Silva *et al.* [39] avaliaram o efeito da imobilização da pancreatina em carvão ativado sobre o perfil peptídico de hidrolisados de soro de leite. O melhor resultado se mostrou inferior aos do presente trabalho com relação ao elevado teor de grandes peptídeos (58,00 %) e baixo teor de aminoácidos livres (2,00 %). Tal como no estudo citado anteriormente, a única vantagem em relação ao presente trabalho, refere-se ao teor de di-tripeptídeos (15,00 %), um pouco superior ao aqui encontrado.

### 3.3 Comparação entre os diferentes tratamentos enzimáticos

Os resultados aqui obtidos serão comparados apenas com os obtidos no mesmo laboratório para a ação da pancreatina sobre o perfil peptídico das proteínas do concentrado protéico do soro de leite, já que não foram encontrados na literatura dados de outros autores.

Para a análise de todos os parâmetros utilizados, levou-se em consideração a redução de custos do processo para adaptação do mesmo a produção em larga escala. Assim, o aumento da concentração inicial da matéria-prima está associado à redução do volume de produto a ser desidratado e, conseqüentemente, tempo e investimento dependido no processo de secagem; a redução da relação E:S está associada ao emprego de menor quantidade de enzima necessária à hidrólise; a diminuição do tempo de reação está relacionada à redução do risco de contaminação bacteriana e menor probabilidade de formação de

produtos de degradação, além de menor consumo de energia.

#### 3.3.1 Efeito da concentração da matéria-prima

Para analisar o efeito da concentração inicial do WPC sobre o perfil peptídico dos hidrolisados, devem ser comparadas as seguintes amostras: P1 com P10, P2 com P11, P3 com P12, P4 com P13, P5 com P14, P6 com P15, P7 com P16, P8 com P17 e P9 com P18, uma vez que os parâmetros tempo de hidrólise, relação E:S, pH e temperatura são mantidos constantes. Em cada uma das partes A, B e C da Figura 2, estão apresentados três destes grupos.

A observação da figura 2 mostra que a vantagem de utilização de uma maior concentração de WPC ocorreu em vários casos e relaciona-se com a obtenção de teores mais elevados de di-tripeptídeos (P3 - 10 % com P12 - 15 %; P7 - 10 % com P16 - 15 %, P8 - 10 % com P17 - 15 %, P9 - 10 % com P18 - 15 %), e de aminoácidos livres (P3 - 10 % com P12 - 15 %, P6 - 10 % com P15 - 15 %, P7 - 10 % com P16 - 15 %, P8 - 10 % com P17 - 15 %, P9 - 10 % com P18 - 15 %), além de menores teores de grandes peptídeos (P3 - 10 % com P12 - 15 %; P7 - 10 % com P16 - 15 %, P8 - 10 % com P17 - 15 %, P9 - 10 % com P18 - 15 %).

Em trabalho realizado anteriormente no mesmo laboratório, Biasutti *et al.* [43] utilizando a mesma pancreatina para hidrolisar as proteínas do soro de leite em pó, também observaram este mesmo efeito vantajoso da utilização de uma maior concentração do soro de leite em pó, especialmente no que se refere ao maior teor de aminoácidos livres (três casos) e menor de grandes peptídeos (três casos), obtidos para uma concentração de 15 % em relação à de 10 %. Entretanto, obteve-se um maior teor de di-tripeptídeos em apenas um caso, ao se utilizar estes dois valores de concentração de matéria-prima.

#### 3.3.2 Efeito da relação E:S

A influência da relação E:S no processo de hidrólise das proteínas do WPC pela pancreatina pode ser avaliada na Figura 3. No intuito de manter os demais parâmetros hidrolíticos constantes, a análise dos dados deve considerar seis grupos contendo, cada um, três hidrolisados: grupo 1 (P1, P2 e P3); grupo 2 (P4, P5 e P6); grupo 3 (P7, P8 e P9); grupo 4 (P10, P11 e P12) grupo 5 (P13, P14 e P15) e grupo 6 (P16, P17 e P18). Em cada uma das partes A, B e C da Figura 3, estão apresentados dois destes grupos.

A análise da figura 3 revela que a utilização de uma menor relação E:S foi vantajosa para alguns casos, uma vez que se verifica a obtenção de um menor teor de grandes peptídeos (P3 - 4:100 com P2 - 2:100 e P3 - 4:100 com P1 -

1:100), além de maior teor de aminoácidos livres (P3 - 4:100 com P2 - 2:100; P3 - 4:100 com P1 -

1:100; P6 - 4:100 com P5 - 2:100) e de di-tripeptídeos (P3 - 4:100 com P2 - 2:100).

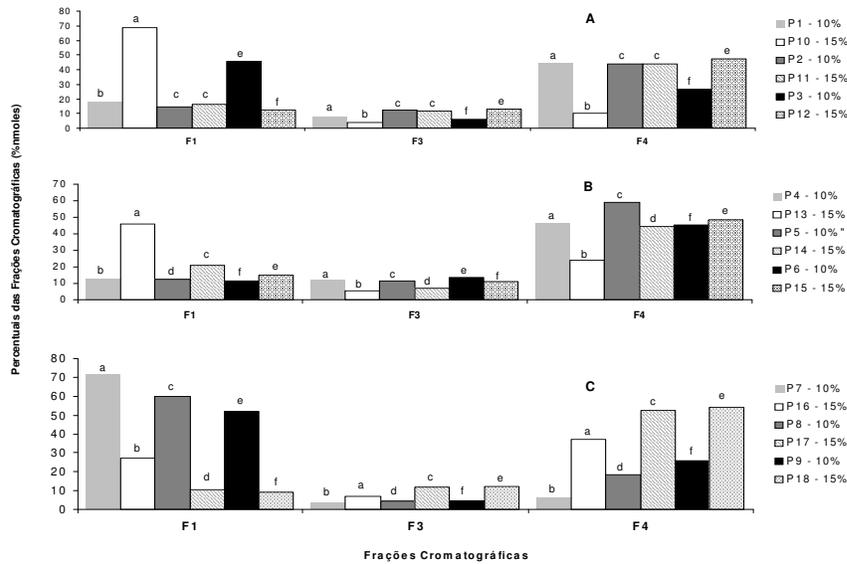


Figura 2: Efeito da concentração de matéria-prima sobre o perfil peptídico de hidrolisados do WPC. Concentrações utilizadas: 10% (P1, P2, P3, P4, P5 P6, P7, P8, P9) e 15% (P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18). F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2+F3: oligopeptídeos (2 a 7 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

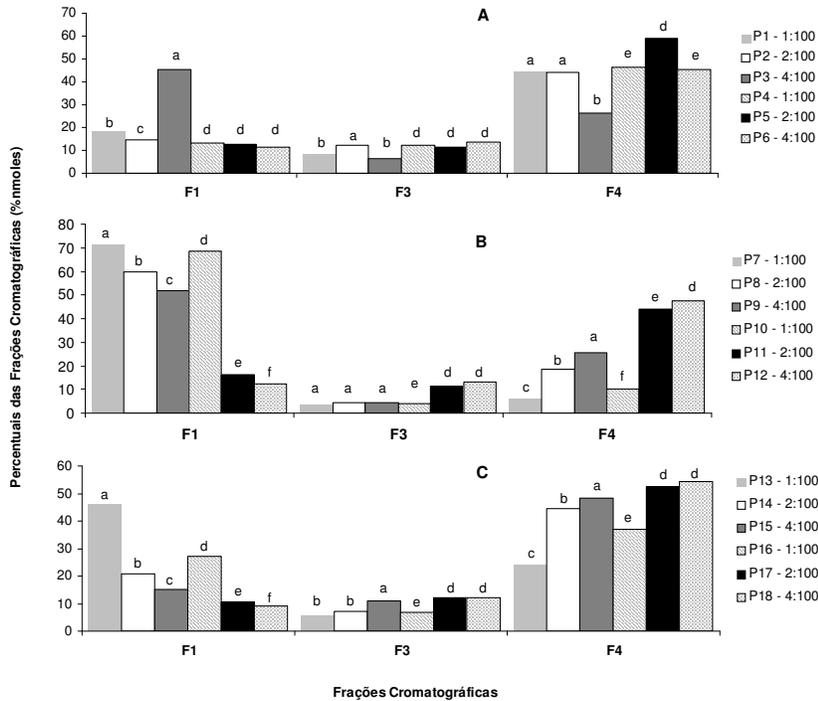


Figura 3: Efeito da relação E:S sobre o perfil peptídico de hidrolisados do WPC. Relações E:S utilizadas: 1:100 (P1, P4, P7, P10, P13, P16), 2:100 (P2, P5, P8, P11, P14, P17) e 4:100 (P3, P6, P9, P12, P15, P18). F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2+F3: oligopeptídeos (2 a 7 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

O trabalho realizado por Biasutti *et al.* [43], no mesmo laboratório do presente estudo, avaliando-se o emprego de três valores para a relação E:S (4:100, 2:100 e 1:100) na hidrólise das proteínas do soro de leite em pó, também demonstraram efeito benéfico, uma vez que se obteve maior teor de aminoácidos livres em seis casos e menor de grandes peptídeos, também em seis casos. Entretanto, observou-se um maior teor de di-tripeptídeos em apenas um caso ao se utilizar estes três valores de relação E:S.

Outros dois estudos empregando-se uma outra pancreatina (Sigma, P-1500) para hidrólise das proteínas do soro de leite foram realizados no mesmo laboratório do presente trabalho. Contudo, o efeito da utilização de uma menor E:S sobre o perfil peptídico foi avaliado após a passagem dos hidrolisados em coluna de carvão ativado para remoção de fenilalanina. Desta forma, Silva *et al.* [39] empregando a pancreatina imobilizada em carvão ativado, observaram que a utilização de uma relação E:S 100 vezes menor (de 1:100 comparado com 0,01:100) foi relativamente benéfica para o perfil peptídico, uma vez que observou-se um teor maior de di-tripeptídeos (de 7,0 % para 15,0 %) mas, por outro lado, obteve-se um menor conteúdo de aminoácidos livres (de 53,0 % para 2,0 %). Delvivo *et al.* [36], utilizaram a pancreatina para hidrolisar as proteínas do soro de leite em solução, mas não verificaram qualquer efeito sobre o perfil peptídico relacionado à utilização de uma menor relação E:S (de 0,1:100 para 0,01:100).

### 3.3.3 Efeito do tempo de hidrólise

A influência do tempo de ação da pancreatina sobre o perfil peptídico do hidrolisado

de WPC pode ser avaliada na Figura 4. No intuito de manter os demais parâmetros hidrolíticos constantes e, de maneira análoga ao processo comparativo realizado para estudar o efeito da relação E:S, a análise dos dados deve considerar seis grupos contendo, cada um, três hidrolisados: grupo 1 (P1, P4 e P7); grupo 2 (P2, P5 e P8); grupo 3 (P3, P6 e P9); grupo 4 (P10, P13 e P16); grupo 5 (P11, P14 e P17); e grupo 6 (P12, P15 e P18). Em cada uma das partes A, B e C da Figuras 4, estão apresentados dois destes grupos.

A análise da figura 4 mostra que a utilização de um menor do tempo de hidrólise foi vantajosa, uma vez que para vários casos obteve-se menor teor de grandes peptídeos (P7 – 15 h com P4 - 10 h e P7 – 15 h com P1 - 5 h; P8 – 15 h com P5 - 10 h; P8 – 15 h com P2 - 5 h; P9 – 15 h com P6 - 10 h; P9 – 15 h com P3 - 5 h; P14 – 10 h com P11 - 5 h; P15 – 10 h com P12 - 5 h), maior de di-tripeptídeos (P7 – 15 h com P4 - 10 h; P7 – 15 h com P1 - 5 h; P8 – 15 h com P5 - 10 h; P8 – 15 h com P2 - 5 h; P9 – 15 h com P6 - 10 h; P14 – 10 h com P11 - 5 h) e de aminoácidos livres (P7 – 15 h com P4 - 10 h; P7 – 15 h com P1 - 5 h; P8 – 15 h com P5 - 10 h; P8 – 15 h com P2 - 5 h; P9 – 15 h com P6 - 10 h).

Biasutti *et al.* [43], neste mesmo laboratório, também observaram efeito benéfico devido à utilização de um menor tempo de hidrólise (15, 10 e 5 h) para ação da pancreatina sobre as proteínas do soro de leite em pó. Assim, obteve-se maior teor de di-tripeptídeos em quatro casos e de aminoácidos livres em seis casos, assim como menor conteúdo de grandes peptídeos em cinco testes.

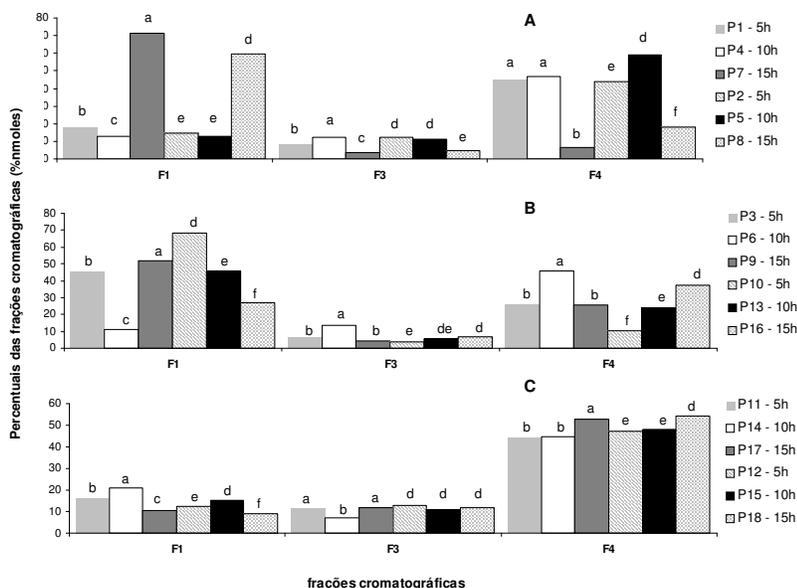


Figura 4: Efeito do tempo de hidrólise sobre o perfil peptídico do WPC. Tempos utilizados: 5h (P1, P2, P3, P10, P11, P12), 10h (P4, P5, P6, P13, P14, P15) e 15h (P7, P8, P9, P16, P17, P18). F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2+F3: oligopeptídeos (2 a 7 resíduos de aminoácidos); F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Para cada comparação, médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no caso de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

#### 4 CONCLUSÃO

A hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite, empregando-se uma pancreatina em algumas das condições aqui testadas, mostrou ser um processo que pode ser utilizado para o aproveitamento deste subproduto industrial, uma vez que permitiu a obtenção de hidrolisados protéicos ricos em di-tripeptídeos e aminoácidos livres, quando comparados com um produto comercial. Este resultado confirma a percepção de que o soro de leite não deve ser tratado como um resíduo, mas como uma matéria-prima com valor nutricional, funcional e econômico, possibilitando a agregação de valor ao longo da cadeia do leite e a redução de custos com os processos de tratamento de efluentes. Portanto, a transformação do soro de leite proporcionará uma melhoria considerável na preservação do meio ambiente.

#### AGRADECIMENTOS

Os Autores agradecem ao CNPq, à Capes e à Fapemig pelo apoio financeiro.

---

#### USE OF WHEY AIMING THE REDUCTION OF ENVIRONMENTAL POLLUTION: HYDROLYSIS BY PANCREATIN

**ABSTRACT:** Aiming the use of an industrial by-product and contribute to reduce the environmental pollution, the goal of this work was to obtain whey protein hydrolysates with high di-tripeptide contents. Pancreatin was used and different hydrolytic conditions were tested. The effect of parameters such as hydrolysis time (5, 10 and 15 h), enzyme:substrate ratio (E:S) (1:100, 2:100 and 4:100) and raw matter concentration (MC) (10 % and 15 %) were tested. The peptide profiles were characterized firstly using a fractionation method by a size-exclusion-HPLC followed by a rapid Correct Fraction Area method for quantifying the peptides. The action of pancreatin produced different peptide profiles depending on the hydrolysis parameters used and the beneficial effect was observed in nine cases, and it was mainly associated with high amount of di-tripeptides (12,11 %, in average) and free amino acids (49,06 %, in average), when compared with a commercial whey protein hydrolysate.

**Keywords:** by-product, environmental pollution, whey, protein hydrolysis, pancreatin, di-tripeptides.

---

#### REFERÊNCIAS

- [1] SGARBIERI, V.C.; Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações; Varela; São Paulo, 517, 1996
- [2] SISO M.I.G.; *Biores. Technol.*, 57, 1-11, 1996.
- [3] HOMEM, G.R.; Avaliação técnico-econômica e análise locacional de unidade processadora de soro de queijo em Minas Gerais. 230, 2004. Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004
- [4] VERSATILIDADE DOS INGREDIENTES LÁCTEOS; USDEC News, 4, 1-7, 2002
- [5] CHERYAN, M.; Ultrafiltration and Microfiltration Handbook; Technomic Publishing Co; Illinois, 527, 1998.
- [6] KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R.C.; *Gut.*, 26, 907-913, 1985.
- [7] GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSKI Jr., M.V.; SILK, D.B.A.; *Clin. Sci.*, 71, 65-69, 1986.
- [8] RERAT, A.A.; *Proc. Nutr. Soc.*, 52, 335-344, 1993.
- [9] FRENHANI, P.B.; BURINI, R.B.; *Arq. Gastroenterol.*, 36, 227-237, 1999.
- [10] BOZA, J.J.; MOËNNOZ, D.; VUICHOUD, J.; JARRET, A.R.; GAUDARD-DE-WECK, D.; BALLÈVRE, O.; *Eur. J. Nutr.*, 39, 237-243, 2000.
- [11] CÂNDIDO, L.M.B. Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcionais. 1998. 207 f. Tese - Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Campinas, 1998.
- [12] CLEMENTE, A.; *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 254-262, 2000.
- [13] MIRA, N.V.M.; MARQUEZ, U.M.L.; *Rev. Saúde Pub.*, 34, 86-96, 2000.
- [14] ADLER-NISSEN, J.; *Alim.*, 6, 29-33, 1981.
- [15] CHOBERT, J-M.; SITOHY, M.Z.; WHITAKER, J.R.; *J. Agric. Food Chem.*, 36, 220-224, 1988.
- [16] CHOBERT, J-M.; BERTRAND-HARD, C.; NICOLAS, M-G.; *J. Agric. Food Chem.*, 36, 883-892, 1988.
- [17] SILVESTRE, M.P.C.; HAMON, M.; YVON, M.; *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2778-2782, 1994.
- [18] SILVESTRE, M.P.C.; HAMON, M.; YVON, M. J.; *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2783-2789, 1994.
- [19] ANANTHARAMAN, K.; FINOT, P.A.; *Food Rev. Int.*, 9, 629-655, 1993.
- [20] PARK, Y.K. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Ed.); *Biotecnologia Industrial*; Edgard Blugher; São Paulo, 3, 363-371, 2001
- [21] HINSBERGER, A.; SANDHU, B.K.; *Cur. Paed.*, 14, 605-611, 2004.
- [22] KINSELLA, J.E.; WHITEHEAD, D.M.; *Adv. Food Nutr. Res.*, 33, 343-437, 1989.
- [23] BRANS, G.; SCHROËN, C.G.P.H.; VAN DER SMAN, R.G.M.; BOOM, R.M.; *J. Memb. Sci.*, 243, 263-272, 2004.



- [24] LEMIEUX, L.; PIOT, J.M.; GUILLOCHON, D.; AMIOT, J.; J. Chromatogr., 32, 499-504, 1991.
- [25] SCHMIDT, D.G.; POLL, J.K.; Neth. Milk Dairy J., 45, 225-240, 1991.
- [26] DAVIS, M.T.; LEE, T.D.; Prot. Sci, 1, 935-944, 1992.
- [27] GOLOVCHENKO, N., KATAEVA, I.A., AKIMENKO, V.K.; J. Chromatogr., 591, 121-128, 1992.
- [28] VISSER, S.; SLAGEN, C.J.; ROBBEN, A.J.P.M.; J. Chromatogr., 599, 205-209, 1992.
- [29] AOAC Association of Official Analytical Chemists, 16 ed., Arlington, 2, 1995.
- [30] NIELSEN S.S. Gaithersburg, 630. 1998.
- [31] MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C.; J.Food Comp.Anal., 13, 843-857, 2000.
- [32] CARREIRA, R.L.; DE MARCO, L.M.; DIAS, D.R.; MORAIS, H.A.; SILVESTRE, M.P.C.; Acta Farm. Bon., 23, 17-25, 2004.
- [33] BARBOSA, C.M.S.; MORAIS, H.A.; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C.; J. Sci. Food Agric., 84, 1891-1900, 2004.
- [34] LOPES, D.C.F.; DELVIVO, F.M.; SILVESTRE, M.P.C.; Brit. Food J., 107, 42-53, 2005.
- [35] MORAIS, H.A.; DE MARCO, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C.; Acta Alim., 34, 59-69, 2005.
- [36] DELVIVO, F.M.; VIEIRA, C.R.; BIASUTTI, E.A.R.; AFONSO, W.O.; SILVESTRE, M.P.C.; Am. J. Food Technol., 1, 94-104, 2006.
- [37] DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; SILVA, V.D.M.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C.; Braz. J. Food Technol., 8, 210-219, 2005.
- [38] SOARES, R.D.L.; BIASUTTI, E.A.R.; CAPOBIANGO, M.; VIEIRA, C.R.; SILVA, V.D.M.; JANUÁRIO, J.N.; AGUIAR, M.J.B.; SILVESTRE, M.P.C.; Acta Farm. Bon., 25, 325-332, 2006.
- [39] SILVA, V.D.M.; 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.; Amer. J. Food Techn., 2, 327-341, 2007.
- [40] PIMENTEL-GOMES, F.; Curso de estatística experimental; 14 ed.; Nobel; Piracicaba, 477, 2000.
- [41] SAMMEL, L.M.; CLAUS, J.R.; Meat Sci., 65, 1293-1299, 2003.
- [42] MORTENSON, M.A.; VICKERS, Z.M.; REINECCIUS, G.A.; Intern. Dairy J., 18, 649-657, 2008.
- [43] BIASUTTI, E.A.R.; AFONSO, W.O.; LOPES Jr., C.O.; COELHO, J.V.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C.; Rev. Bras. Ciênc. Farm., 44, 51-61, 2008.
- [44] BIZZOTTO, C.S.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, V.D.M.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C.; Rev. Ciênc. Agrotecnol., 30, 308-316, 2006.
- [45] SCHMIDT, D.G.; MARKWIJK, B.W.V.; Neth. Milk Dairy J., 47, 15-22, 1993.
- [46] GALLAGHER, J.; KANEKANIAN, A.D.; EVANS, E.P.; Int. J. Food Sci. Tech., 29, 279-285, 1994.
- [47] DEESLIE, W.D; CHERYAN, M.; J. Agric. Food Sci., 57, 26-31, 1991.
- [48] DIZDAROGLU, M.; J. Chromatog., 334, 49-69, 1985.
- [49] LI-JUN, L.; CHUAN-HE, Z.; ZHENG, Z.; Food Bioprod. Proc., 86, 1-6, 2007.
- [50] SAINT-SAUVEUR, D.; GAUTHIER, S.F.; BOUTIN, Y.; MONTONI, A.; Int. Dairy J., 18, 260-270, 2008.
- [51] GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M.P.; GUADIX, E.M.; Biotechnol. Bioeng., 44, 529-532, 1994.