

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS DE CONCENTRADO
PROTEICO DE SORO DE LEITE COM ATIVIDADE
INIBITÓRIA DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA: AÇÃO DAS PROTEASES DO *Bacillus
licheniformis* E DO *Aspergillus oryzae***

**PREPARATION OF HYDROLYZED WHEY PROTEIN
CONCENTRATE WITH INHIBITORY ACTIVITY OF
ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME: BACILLUS
LICHENIFORMIS AND ASPERGILLUS ORYZAE
PROTEASES ACTION**

Marialice Pinto Coelho Silvestre*
Harriman Aley Moraes**
Viviane Dias Medeiros Silva***
Mauro Ramalho Silva***

RESUMO

As proteases do *Bacillus licheniformis* e do *Aspergillus oryzae*, nas relações Enzima: Substrato (E:S) de 0,5:100, 1:100, 2:100, 3:100, 4:100 e 8:100, foram utilizadas no presente trabalho para a obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico de soro de leite com atividade inibitória (AI) da enzima conversora de angiotensina. Esta atividade foi avaliada *in vitro*, empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa e o ácido hipúrico como padrão. Dentre os doze hidrolisados preparados, sete apresentaram AI considerada muito alta (> 80%), sendo que os obtidos pela ação da protease de *Bacillus licheniformis* apresentaram maiores valores que os da outra enzima. Observou-se ainda efeito benéfico da associação do emprego de uma menor relação E:S com a obtenção de maior valor da AI, nas ações das proteases de *Bacillus licheniformis*, ao se passar de 2:100 para 1:100, e de *Aspergillus oryzae*, ao se passar de 3:100 para 2:100 e de 2:100 para 1:100.

Palavras-chave: Concentrado proteico de soro de leite. Hidrólise enzimática. Enzimas microbiana. Relação enzima: substrato. Enzima conversora de angiotensina.

ABSTRACT

The proteases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus oryzae* in enzyme: substrate ratios (E:S) of 0.5:100, 1:100, 2:100, 3:100, 4:100 and 8:100 were used in the present study to obtain hydrolysates from whey protein concentrate with angiotensin converting enzyme inhibitory activity (AI). This activity was

* Universidade Federal de Minas Gerais. E-mail: <malice@ufmg.br>.

** Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. E-mail: <hamorais@gmail.com>.

*** Edetec Indústria Alimentícia S/A. E-mail: <viviane@edetec.com.br>; <mauro@edetec.com.br>.

evaluated in vitro using reverse phase high performance liquid chromatography and hippuric acid as standard. Among the twelve hydrolysates, seven showed AI considered very high ($> 80\%$), and those obtained by the action of the protease from *Bacillus licheniformis* showed higher values than those of the other enzyme. In addition, a beneficial effect of the association of the use of a smaller E: S with a higher value of AI was observed in the actions of the proteases from *Bacillus licheniformis* when passing from 2:100 to 1:100, and from *Aspergillus oryzae* when passing from 3:100 to 2:100 and from 2:100 to 1:100.

Keywords: Whey protein concentrate. Enzymatic hydrolysis. Microbial enzymes. Enzyme: substrate ratio. Angiotensin-converting enzyme.

1. Introdução

Considerado um dos mais importantes subprodutos agroindustriais, o soro do leite é o líquido remanescente da fabricação de queijos, por coagulação da caseína, obtido por adição de ácido (precipitação isoelétrica da caseína) ou por ação enzimática (soro doce). Este derivado lácteo apresenta em sua composição química aproximadamente 93-94% de água, 4,5-5,0% de lactose, 0,7-0,9% de proteínas solúveis e 0,6-1,0% de sais minerais (MORENO-INDIAS et al., 2009).

O concentrado proteico do soro de leite (WPC) é um produto obtido após a separação em membranas das proteínas do soro de leite, apresentando elevada quantidade de proteínas na faixa de 35 a 80% (BRANS et al., 2004). Além disso, consiste em um ingrediente amplamente utilizado na indústria alimentícia, devido às suas características físico-químicas e sensoriais favoráveis, como boa solubilidade em água, capacidade de transportar pequenas moléculas lipofílicas, ação tensoativa e propriedades geleificantes (OHATA et al., 2005). Ressalta-se ainda que suas proteínas apresentam elevado valor nutricional em virtude do alto conteúdo de aminoácidos essenciais (SGARBIERI, 2004).

O WPC apresenta algumas vantagens em relação ao soro de leite *in natura*, tais como: maior teor de proteínas, maior estabilidade, conservação das características físico-químicas dos componentes, além da facilidade de manipulação laboratorial (BRANS et al., 2004).

No intuito de ampliar o aproveitamento das proteínas do soro de leite, pode-se empregar o tratamento enzimático, dando origem a hidrolisados proteicos, uma vez que este processo é capaz de

contribuir para a melhoria das propriedades físicas, químicas, funcionais, sensoriais e nutricionais destes nutrientes, atuando, particularmente, nas características de absorção (FRENHANI; BURINI, 1999; PEDROCHE et al., 2004).

São diversas as aplicações associadas aos hidrolisados proteicos, destacando-se dietas de indivíduos que apresentam necessidades nutricionais e/ou fisiológicas não cobertas pela alimentação convencional, como os recém-nascidos prematuros, crianças com diarreia, gastroenterite, quadros gerais de má-absorção e fenilcetonúricos (CLEMENTE, 2000; MIRA; MARQUEZ, 2000). Além disso, o uso de hidrolisados proteicos tem recebido ampla atenção nos últimos anos, como principal constituinte de produtos geriátricos, suplementos de alto valor calórico, soluções parenteral e/ou enteral, fórmulas infantis e alimentos hipoalergênicos (PEDROCHE et al., 2004).

Além dessas aplicações, vários trabalhos relatam o isolamento de peptídeos bioativos, provenientes do tratamento enzimático de proteínas alimentares, com capacidade de desempenhar diversas atividades benéficas no organismo, como antitrombótica, anti-hipertensiva, antimicrobiana, antiviral, antitumoral, anticoagulante, opioide, imunomoduladora, hipocolesterolêmica e antioxidante (CLARE; SWAISGOOD, 2000; PIHLANTO-LEPPÄLLÄ, 2001; HA; ZEMEL, 2003; SILVA, MALCATA, 2005; WANG; MEJIA, 2005; HARTMANN; MEISEL, 2007; SAINT-SAUVEUR et al., 2008).

Várias enzimas podem ser utilizadas para o preparo de hidrolisados proteicos. No presente estudo, foi avaliada a ação das proteases do *Bacillus licheniformis* e do *Aspergillus oryzae*. A primeira

refere-se a uma endopeptidase de origem bacteriana, de ampla especificidade para ligações peptídicas, com preferência para resíduo não carregado na posição N-terminal, como glutamina (BRENDA, 2011). A segunda se refere a uma protease de função mista (endo e exopeptidase), de ampla especificidade apresentando preferência para os aminoácidos hidrofóbicos (RAO et al., 1998).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) representa um sério problema de saúde pública e constitui um dos mais importantes fatores de risco para diversas doenças cardiovasculares. Além disso, é considerada uma doença, responsável, no Brasil e no mundo, por, aproximadamente, 40% das mortes por acidente vascular cerebral, 25% das mortes por doença arterial coronariana e, quando associada com diabetes, é responsável por 50% dos casos de insuficiência renal terminal (BRASIL, 2006).

A enzima conversora de angiotensina (ECA) desempenha um papel crucial na regulação da pressão arterial, uma vez que promove a conversão da angiotensina I para angiotensina II, que é um potente vasoconstritor. Paralelamente, essa enzima é responsável pela inativação da bradicinina, que é um vasodilatador. Assim, inibidores sintéticos da ECA são frequentemente utilizados no tratamento da hipertensão arterial (ERDMANN et al., 2008).

Vários autores têm demonstrado o efeito inibitório de peptídeos e hidrolisados proteicos sobre a ECA (LEE et al., 2008; RAGHAVAN; KRISTINSSON, 2009; TORRUCO-UCO et al., 2009). Estes peptídeos, denominados de bioativos, representam sequências de aminoácidos que se encontram inativas na proteína intacta, porém, após a hidrólise, tornam-se ativas, sendo capazes de exercer diversas atividades benéficas ao organismo (HARTMANN; MEISEL, 2007).

Uma das mais importantes fontes de peptídeos bioativos constitui nas proteínas do leite, sendo que em vários estudos já foi relatada a atividade inibitória de hidrolisados e peptídeos obtidos dessas proteínas sobre a ECA, sugerindo-se que estes produtos podem ser introduzidos na dieta, representando assim uma forma alternativa na prevenção e no tratamento não medicamentoso da hipertensão arterial (COSTA et al., 2007; JIANG et al., 2007; MIGUEL et al., 2007; OTTE et al., 2007).

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho consistiu em avaliar a ação das proteases do *Bacillus licheniformis* e do *Aspergillus oryzae* sobre as proteínas do WPC, com o intuito de se obter hidrolisados enzimáticos com elevada atividade inibitória da ECA. O efeito da relação E:S sobre esta atividade foi, igualmente, estudado.

2. Material e métodos

2.1 Material

O concentrado proteico de soro de leite (WPC-*whey protein concentrate*) na forma de pó (Kerrylac 750) foi doado pela Kerry do Brasil Ltda (Três Corações, MG, Brasil). As proteases de *Bacillus licheniformis* (Alcalase®, atividade 6,22 U/mL) e de *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme®, atividade 0,69 U/mL) foram gentilmente cedidas pela AB Enzymes (Barueri, SP, Brasil). Neste trabalho, uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µg de tirosina, em um minuto, a 37 °C.

A enzima conversora de angiotensina – ECA (E.C 3.4.15.1, 0,25 U.mg⁻¹), o hipuril-histidil-leucina (HHL) e o ácido hipúrico (AH) foram adquiridos da Sigma (Saint Louis, MO, EUA). O ácido trifluoroacético e o ácido acético, ambos de grau HPLC, foram obtidos da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil). O metanol, grau HPLC, foi fornecido pela JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). As membranas de fluoreto de polivinildieno para filtração das amostras (0,22 mm) e dos solventes (0,45 mm), assim como o sistema de fluxo tangencial com porosidade de corte para peso molecular de 10 KDa foram adquiridos da Millipore (São Paulo, SP, Brasil). Todos os demais reagentes empregados neste trabalho eram de grau analítico.

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR), usado na determinação da atividade inibitória sobre a ECA, era constituído por uma coluna cromatográfica GraceSmart RP-18, 150 x 4,6 mm, 5 mm e 120 Å (Grace Davison, Deerfield, IL, EUA), uma bomba isocrática e um detector espectrofotométrico UV-VIS (série 1200, Agilent, SantaClara, Estados Unidos), acoplado a um computador com software Chem Station for LC Systems (Agilent, Santa Clara, Estados Unidos).

A água utilizada no preparo da fase móvel foi purificada em sistema MilliQ (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos).

2.2 Métodos

2.2.1 Preparo dos hidrolisados enzimáticos de concentrado proteico de soro de leite

Foram preparados doze hidrolisados enzimáticos, empregando-se as proteases do *Bacillus licheniformis* e do *Aspergillus oryzae* e variando-se a relação E:S (0,5:100, 1:100, 2:100, 3:100, 4:100 e 8:100). As condições empregadas no preparo destes hidrolisados estão apresentadas na Tabela 1, sendo que os valores de pH e temperatura correspondem às faixas ótimas fornecidas pelo fabricante das enzimas.

As soluções a 10 g% (p/v) de concentrado proteico de soro de leite foram preparadas em água destilada, correspondendo a 3,42% de proteína, sendo o pH ajustado para 7,0 ou 8,0, com solução de NaOH a 3 mol.L⁻¹. Posteriormente, foram aquecidas em banho de vaselina, sob agitação constante em agitador magnético (modelo 752A, Fisatom, São

Paulo, SP, Brasil), seguida da adição das enzimas em quantidades adequadas para se obter a relação E:S desejada. O tempo total de hidrólise foi de 5 horas e, após este período, as enzimas foram inativadas por aquecimento em banho-maria a 75 °C, durante 15 segundos. Todas as amostras foram liofilizadas (Freeze Dry System/FreeZone 4,5, model 77500, LABCONCO, Kansas City, Estados Unidos) e armazenadas em freezer (- 4 °C) até o momento do uso.

2.2.2 Avaliação *in vitro* da atividade inibitória dos hidrolisados proteicos sobre a ECA

O preparo das amostras para a avaliação da atividade inibitória dos hidrolisados enzimáticos de WPC sobre a ECA foi realizada de acordo com Wu et al. (2002). Assim, um volume de 12,5 µL de solução de HHL (2,17 mmol.L⁻¹) foi misturado com 50 µL das soluções de hidrolisados (10 mg.mL⁻¹), ambas preparadas em tampão borato a 100 mmol.L⁻¹, contendo solução de NaCl a 300 mmol.L⁻¹, em pH 8,3, e a mistura foi incubada a 37 °C por 10 minutos. Um volume de 200 µL de ECA (4 mU), preparada no mesmo tampão, foi submetido a este mesmo tra-

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

HIDROLISADOS	TIPO DE ENZIMA	E:S	pH	TEMPERATURA
H1	Protease de <i>Bacillus licheniformis</i>	0,5:100	8,0	60 °C
H2		1:100		
H3		2:100		
H4		3:100		
H5		4:100		
H6		8:100		
H7	Protease de <i>Aspergillus oryzae</i>	0,5:100	7,0	50 °C
H8		1:100		
H9		2:100		
H10		3:100		
H11		4:100		
H12		8:100		

E:S = relação enzima substrato

tamento. Em seguida, as soluções foram misturadas e, após a incubação a 37 °C por 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 125 µL de HCl (1,0 mol.L⁻¹). A mistura foi, então, filtrada em membrana de 0,22 µm, para a análise por CLAE-FR. Soluções padrão de ácido hipúrico (AH), em concentrações variando de 0,05 a 7,25 mmol.L⁻¹, também foram submetidas a este mesmo tratamento, para a construção de uma curva de calibração.

A medida da atividade inibitória da ECA foi baseada na liberação de ácido hipúrico, como proposto por Cushman e Cheung (1971), o qual foi quantificado por CLAE-FR, nas condições cromatográficas propostas por Yu et al. (2006). Assim, as amostras foram analisadas em coluna GraceSmart RP-18, sendo o AH e o hipuril-histidil-leucina (HHL) detectados a 228 nm. A corrida cromatográfica ocorreu a um fluxo isocrático de 0,8 mL.min⁻¹, com fase móvel sendo composta de metanol (30%), ácido trifluoroacético (0,1%) e ácido acético (0,05%). Para a realização das análises, foram injetados 50 µL de amostra, na temperatura de 25 °C, com tempo de corrida de 10 minutos.

A atividade inibitória da ECA foi expressa de duas maneiras, ou seja, em percentual de inibição e como valor IC₅₀, definido como a concentração de hidrolisados (mg.mL⁻¹) requerida para inibir 50% da atividade enzimática.

2.2.3 Avaliação do efeito de alguns parâmetros

O efeito do tipo de enzima e da relação E:S foi avaliado considerando-se a obtenção de hidrolisados com maior atividade inibitória sobre a ECA e a redução de custos do processo para adaptação em larga escala (uso da menor E:S).

2.2.4 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo os resultados expressos como média ± desvio padrão. Para verificar a presença de efeitos significativos entre os diferentes tratamentos, foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema de análise fatorial (2 enzimas x 6 relações enzima:substrato), sendo os resultados analisados com o software *Statistica* (STAT SOFT, 2000). A

análise de variância foi empregada para determinar o efeito do tipo de enzima e da relação E:S nos percentuais de inibição e nos valores de IC₅₀. As diferenças significativas (p < 0,05) entre as médias foram avaliadas pelo teste de Duncan (PIMENTEL-GOMES, 2000).

3. Resultados e discussão

Na tabela 2, pode-se verificar que a atividade inibitória dos hidrolisados enzimáticos de WPC variou de 68,84 a 96,66%, e a IC₅₀ de 0,67 a 0,94 mg/mL. Dentre os doze hidrolisados avaliados, sete apresentaram AI que poderia ser considerada muito alta (> 80%: H1 a H6; H12), e quatro que poderia ser classificada como alta (> 70%: H8 a H11), quando comparados com as faixas de valores relatadas na literatura (OTTE et al., 2007). Apenas um hidrolisado (H7) revelou atividade inibitória moderada (na faixa de 60%) e nenhuma amostra demonstrou possuir baixa capacidade para inibir a ECA (< 20%). Ressalta-se ainda, que os maiores resultados para a AI foram obtidos quando foram empregadas as duas enzimas na relação E:S de 8:100, sendo o valor obtido pela protease de *Bacillus licheniformis* (H6: 96,66%) superior ao da protease de *Aspergillus oryzae* (H12: 90,22%).

No presente estudo, a atividade inibitória da proteína intacta (WPC não hidrolisado) sobre a ECA

Tabela 2 - Atividade inibitória dos hidrolisados de WPC sobre a ECA

Hidrolisados	Inibição (%)	IC50 (mg/mL)
H1	82,66 ± 0,74 d	0,78 ± 0,007 g
H2	83,69 ± 0,21 c	0,77 ± 0,002 g
H3	80,16 ± 0,93 e	0,80 ± 0,009 f
H4	83,11 ± 0,69 cd	0,78 ± 0,006 g
H5	89,47 ± 0,45 b	0,72 ± 0,004 h
H6	96,66 ± 0,27 ^a	0,67 ± 0,002 i
H7	68,84 ± 0,57 j	0,94 ± 0,008 a
H8	76,54 ± 0,19 g	0,84 ± 0,002 d
H9	74,64 ± 0,40 h	0,86 ± 0,005 c
H10	70,28 ± 0,70 i	0,92 ± 0,009 b
H11	78,20 ± 0,06 f	0,83 ± 0,001 e
H12	90,22 ± 0,65 b	0,72 ± 0,005 h

Os resultados representam as médias de triplicatas, que se indicadas por letras iguais (a, b, c,...) não diferem entre si a 5% de significância, para uma mesma coluna.

foi excessivamente baixa (1,3%), indicando que o tratamento enzimático, o qual dá origem a moléculas de tamanhos menores, é necessário para a manifestação desta propriedade bioativa. Em outro estudo, provavelmente devido ao emprego de metodologia diferente do presente trabalho, não foi encontrada qualquer atividade inibitória da ECA para o WPC (SILVA, 2010).

Da mesma maneira, outros autores mencionam fato semelhante, porém utilizando métodos diferentes do presente estudo na determinação da atividade inibitória da ECA. Assim, Mullally et al. (1997) encontraram baixos valores de AI para a α -lactalbumina (3,5%), WPC (7,1%) e β -lactoglobulina (9,6%), antes de se proceder a hidrólise por meio de várias enzimas proteolíticas. Nesse caso, nenhuma atividade inibitória foi observada para a β -lactoglobulina ovina e caprina, antes de serem hidrolisadas por diferentes proteases (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2002). Mais recentemente, Guo et al. (2009) reportam uma AI inferior a 20%, para WPC 80, enquanto que Wang et al. (2010) relataram um valor inferior a 10% para um isolado protéico de soro de leite.

A atividade inibitória da ECA tem sido relacionada, na maioria das vezes, a peptídeos de baixa massa molecular, os quais usualmente contêm de 2 a 12 resíduos de aminoácidos, embora peptídeos com mais de 20 resíduos de aminoácidos também já tenham sido identificados (LÓPEZ-FANDIÑO et al., 2006). Assim, Pihlanto-Leppälä et al. (1998), ao analisarem hidrolisados de proteínas do soro de leite, demonstraram que os peptídeos com massa inferior a 1.000 Da, contendo de 6 a 8 resíduos de aminoácidos, foram os que apresentaram maior atividade inibitória sobre a ECA. Em outro estudo, Chobert et al. (2005) observaram que o aumento do tempo de hidrólise da β -lactoglobulina, pela tripsina, promoveu um aumento da AI de 85 para 92% associado a uma redução do tamanho dos peptídeos, o qual, entretanto, não foi mencionado pelos autores.

Esta correlação entre tamanho de peptídeos e atividade inibitória da ECA foi igualmente, mencionada para a β -lactoglobulina (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2002) e para a caseína (CONTRERAS et al., 2009), sendo que em ambos trabalhos, os peptídeos mais potentes obtidos pela hidrólise enzimática dessas proteínas apresentaram massas moleculares

inferiores 870 Da, e eram constituídos de 3 a 8 resíduos de aminoácidos. Já, no estudo de Tsai et al. (2008), os peptídeos inibidores da ECA, obtidos a partir da hidrólise de proteínas do soro de leite, foram separados em quatro frações (F1: 530 Da; F2: 840 Da; F3: 1.390 Da e F4: 1.530), tendo sido verificado o maior percentual de atividade inibitória na fração F1, que continha peptídeos com 3 a 4 resíduos de aminoácidos.

Por outro lado, Otte et al. (2007) relatam que os peptídeos mais potentes obtidos pela hidrólise enzimática da α -lactoalbumina e da β -caseína, apresentaram massas moleculares ao redor de 1.000 Da e 2.000 Da, respectivamente, demonstrando que mesmo peptídeos contendo acima de doze resíduos de aminoácidos poderiam apresentar atividade inibitória da ECA considerável.

Alguns trabalhos sobre atividade inibitória da ECA de hidrolisados enzimáticos de WPC foram encontrados na literatura, sendo três de outros autores e um desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa do presente trabalho. Ressalta-se que, em nenhum destes estudos, foram utilizadas as enzimas do presente trabalho.

Assim, com relação ao WPC, Mullally et al. (1997), empregando cinco diferentes proteases (tripsina, quimotripsina, elastase, PTN3.0S e pancreatina), obtiveram hidrolisados cuja AI variou de 35,0 a 88,6%, faixa essa que abrange a dos resultados encontrados no presente estudo. Ven et al. (2002) utilizaram uma pancreatina na hidrólise de WPC 60, variando diversos parâmetros hidrolíticos, tendo observado que os valores de IC_{50} de todos os hidrolisados variou entre 0,17 a 0,88 mg/mL, faixa essa que engloba alguns dos valores observados no presente trabalho. Por outro lado, Guo et al. (2009) empregaram apenas uma enzima para hidrolisar o WPC (protease de *Lactobacillus helveticus* LB13), testando a influência de vários parâmetros hidrolíticos, tendo obtido hidrolisados cuja atividade inibitória da ECA variou de 15 a 63%, faixa essa inferior à dos resultados encontrados no presente estudo.

Em outro estudo do mesmo grupo de pesquisa, Silva (2010) promoveu a hidrólise do WPC com uma pancreatina, tendo verificado que a atividade inibitória da ECA variou de 79,28% a 91,88%, nas relações E:S de 0,5:100 a 3:100, respectivamente, valores estes próximos aos encontrados no presente trabalho.

3.1 Efeitos de alguns parâmetros na atividade inibitória da ECA

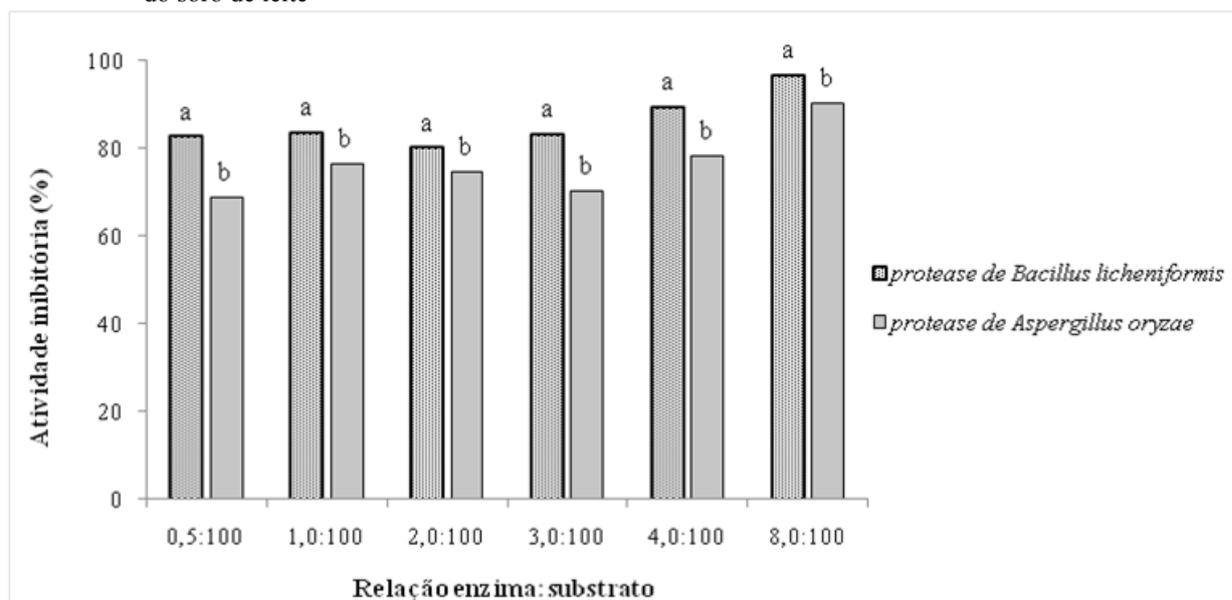
3.1.1 Efeito do tipo de enzima

Com o intuito de se avaliar a influência do tipo de enzima sobre a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados de WPC, as amostras foram divididas em seis grupos, cada um correspondendo a um valor de E:S (0,5:100 a 8:100), como mostrado na figura 1.

Observa-se nesta figura a vantagem do emprego da protease de *Bacillus licheniformis* sobre a protease de *Aspergillus oryzae*, uma vez que a ação desta enzima levou à obtenção de maiores resultados de AI, para todos os valores de E:S testados.

Estes resultados indicam que a escolha da enzima para a hidrólise proteica pode afetar a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados obtidos, uma vez que a estrutura dos peptídeos liberados por este tratamento influencia esta propriedade. Assim, sabe-se que os inibidores mais potentes consistem nos peptídeos que contêm aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina, fenilalanina), hidrofóbicos (prolina) ou básicos (lisina ou arginina) na porção C-terminal (LÓPEZ-FANDIÑO et al., 2006; FERREIRA et al., 2007), enquanto que a presença de um resíduo de ácido glutâmico nesta porção pode reduzir a potência de inibição desses peptídeos. Com relação à porção N-terminal, é desejável que ela seja constituída de aminoácidos dicarboxílicos ou ramificados, como a valina e isoleucina (LI et al., 2005; COSTA et al., 2007).

Figura 1 - Efeito do tipo de enzima sobre a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite



Os resultados representam as médias de triplicatas, que se indicadas por letras iguais (a, b) não diferem entre si a 5% de significância, no caso de diferentes enzimas para uma mesma relação enzima:substrato.

Assim sendo, em função das especificidades das enzimas utilizadas, o resultado obtido para a protease de *Bacillus licheniformis* era esperado uma vez que se trata de uma endopeptidase que cliva, preferencialmente, ligações peptídicas envolvendo aminoácidos hidrofóbicos (GUPTA et al., 2002; DOUCET et al., 2003), o que pode ter levado à formação de peptídeos com estes aminoácidos na porção C-terminal.

Com relação à protease de *Aspergillus oryzae*, provavelmente, os resultados observados podem estar associadas ao fato de que esse preparado enzimático (Flavourzyme™) deva ser composto por diferentes enzimas, que podem favorecer ou prejudicar a liberação de peptídeos que possuam ação inibitória da ECA. De acordo com a base de dados MEROPS (RAWLINGS et al., 2010), existem 126 tipos de proteases/peptidases que podem ser produzidas por este tipo de fungo. Além disso, os

menores valores de AI verificados para a protease de *Aspergillus oryzae*, quando comparados com as da protease *Bacillus licheniformis*, também podem ser, pelo menos em parte, atribuídos a sua menor atividade enzimática (0,69 U/mL e 6,22 U/mL, respectivamente).

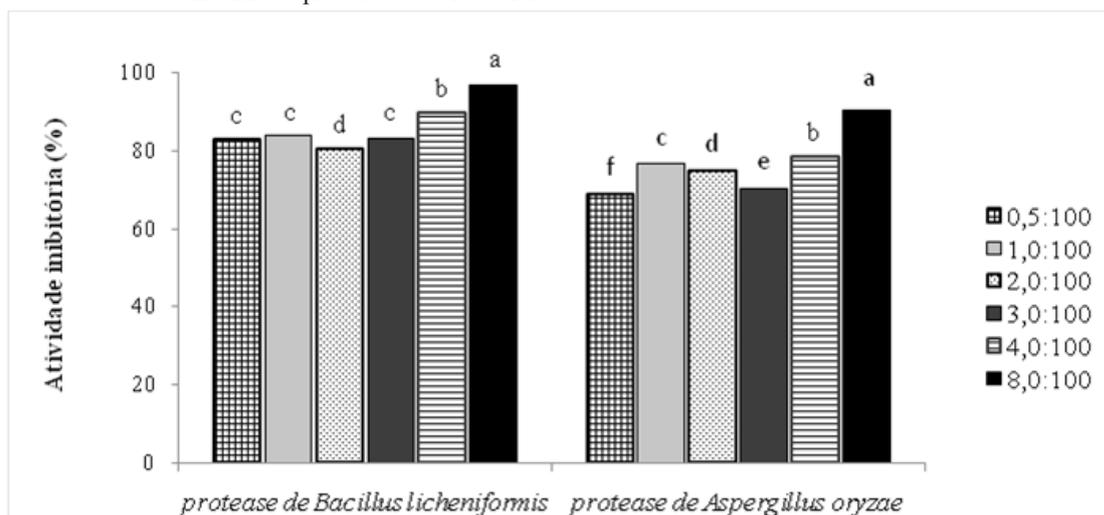
Somente dois estudos foram encontrados na literatura abordando o efeito do tipo de enzima sobre a atividade inibitória da ECA de hidrolisados de WPC, sendo um do mesmo grupo de pesquisa do presente trabalho e um de outros pesquisadores (MULLALLY et al., 1997). Ressalta-se que em nenhum destes estudos foram utilizadas as enzimas do presente trabalho. No primeiro caso, Silva (2010) utilizou uma pancreatina e uma papaína para hidrolisar o WPC, tendo verificado que as maiores AI foram observadas para os hidrolisados produzidos pela ação da primeira enzima, quando comparados com a papaína. Segundo este autor, o melhor desempenho da pancreatina pode estar associado, pelo menos em parte, à ação da quimotripsina, uma das enzimas presentes nesse complexo enzimático, que hidrolisa ligações peptídicas na posição C-terminal dos aminoácidos aromáticos, liberando, assim, peptídeos com atividade inibitória da ECA. Por outro lado, o autor ainda afirma que a papaína, por ser uma endopeptidase que atua na clivagem de substratos contendo resíduos de aminoácidos de lisina, arginina ou valina, originaria peptídeos menos potentes.

Com relação ao trabalho de outros pesquisadores, Mullally et al. (1997) avaliaram o efeito de cinco enzimas, tendo mostrado que as mais eficientes foram a tripsina (88,6%) e a quimotripsina (87,7%), seguidas pela pancreatina (78,2%), PTN 3.0S (60,8%) e, por último, a elastase (35,5%). De acordo com estes autores, os menores valores de AI observados para esta última enzima relacionam-se ao fato de ela hidrolisa ligações peptídicas envolvendo aminoácidos com cadeias laterais não aromáticas e não carregadas, o que levaria a formação de peptídeos com baixa ação inibitória da ECA. Além disso, estes autores afirmaram que os resultados inferiores da pancreatina, quando comparados aos da tripsina e da quimotripsina, podem também ser explicados pelo fato de que esse preparado enzimático possui atividade de elastase.

3.1.2 Efeito da relação enzima: substrato

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

Figura 2 - Efeito da relação enzima:substrato (E:S) sobre a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite.



Os resultados representam a média de triplicatas, que se indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de significância, no caso de diferentes relações enzima:substrato para uma mesma enzima.

Observa-se nesta figura que, de uma maneira geral, existe uma tendência em se obter uma maior AI ao se aumentar a relação E:S e o maior resultado foi encontrado para uma E:S de 8:100, para as duas enzimas testadas. Entretanto, em alguns casos observados para as duas enzimas, foi possível obter o efeito benéfico da utilização de uma menor relação E:S, em termos de redução de custos para aplicação em larga escala. Assim, a ação da protease de *Bacillus licheniformis* levou a um maior valor de AI ao se passar de 2:100 para 1:100, tendo o mesmo ocorrido para a protease de *Aspergillus oryzae*, ao se passar de 3:100 para 2:100 e de 2:100 para 1:100.

Somente dois trabalhos foram encontrados na literatura onde se estudou o efeito da relação E:S sobre a atividade inibitória da ECA de hidrolisados enzimáticos de WPC, sendo que em nenhum deles foi avaliada uma faixa tão ampla de relação E:S, como no presente estudo. No primeiro, do mesmo grupo de pesquisa deste estudo, Silva (2010) mostrou que, para a pancreatina, a AI aumentou de forma acentuada ao se passar 1:100 para 0,5:100. No caso da papaína, foi observada uma elevação importante da AI, ao se passar de 3:100 para 2:100.

No segundo trabalho, este efeito benéfico da utilização de uma menor relação E:S não foi observado por Guo et al. (2009), que empregaram uma protease do *Lactobacillus helveticus* na hidrólise do WPC, e verificaram que a diminuição da relação E:S de 1,2 até 0,2:100 não resultou em alterações significativas dos valores da AI, que oscilaram entre 63 e 59%, respectivamente.

O fato de que, em alguns casos, o emprego de uma menor relação E:S possa levar à obtenção de hidrolisados com maior atividade inibitória da ECA, poderia estar relacionado à existência de uma condição ótima de hidrólise, fora da qual poderia ocorrer maior degradação do que formação de peptídeos inibidores da ECA, diminuindo, assim, a atividade inibitória (RAGHAVAN; KRISTINSSON, 2009).

4. Conclusão

O estudo da ação das proteases de *Bacillus licheniformis* e de *Aspergillus oryzae* sobre o WPC, revelou que o tipo de enzima e a relação E:S influenciaram a capacidade dos hidrolisados enzimáticos em inibir a ECA. O emprego da protease de *Bacillus*

licheniformis mostrou ser mais vantajoso do que o da protease de *Aspergillus oryzae*, tendo levado à produção de hidrolisados com as maiores taxas de inibição da ECA, sendo o maior resultado observado na relação E:S de 8:100. O efeito benéfico da utilização de uma menor relação E:S, na obtenção de maior valor de atividade inibitória da ECA, foi observado, para alguns casos, na ação de ambas as enzimas.

5. Agradecimentos

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

Referências

- BRANS, G.; SCHROËN, C. G. P. H.; VAN DER SMAN, R. G. M.; BOOM, R. M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, Atlanta, v. 243, n. 1-2, p. 263-272, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **V Diretrizes brasileira de hipertensão**. São Paulo: MS, 2006. 50 p.
- BRENDA. The Comprehensive Enzyme Information System. **EC 3.4.21.62 – Subtilisin**. 2011. Disponível em: <http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.4.21.62>. Acesso em: 20 mar 2011.
- CHOBERT, J.-M.; EL-ZAHAR, K.; SITOHY, M.; DALGALARRONDO, M.; MÉTRO, F.; CHOISSET, Y.; HAERTLÉ, T. Angiotensin I-converting-enzyme (ACE)-inhibitory activity of tryptic peptides of ovine β -lactoglobulin and of milk yoghurts obtained by using different starters. **Lait**, Les Ulis, v.85, p.141-152, 2005.
- CLARE, D. A.; SWAISGOOD, H. E. Bioactive milk peptides: a prospectus. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.83, n.6, p.1187-1195, 2000.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Food Science & Technology**, Londres, v.11, n.7, p.254-262, 2000.
- CONTRERAS, M.M.; CARRÓN, R.; MONTERO, M.J.; RAMOS, M.; RECIO, I. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. **International Dairy Journal**, Barking, v.19, p.566-573, 2009.
- COSTA, E. L.; GONTIJO, J. A. R.; NETTO, F. M. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, Barking, v.17, n.6, p.632-640, 2007.
- CUSHMAN, D.W.; CHEUNG, H. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme

- of rabbit lung. **Biochemical Pharmacology**, Nova Iorque, v.20, p.1637-1648, 1971.
- DOUCET, D.; OTTER, D.E.; GAUTHIER, S.F.; FOEGEDING, E.A. Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.51, p.6300-6308, 2003.
- ERDMANN, K.; CHEUNG, B. W. Y.; SCHRÖDER, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Lexington, v.19, n.10, p.643-654, 2008.
- FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; PINHO, O.; MOTA, M. V.; TAVARES, P.; PEREIRA, A.; GONÇALVES, M. P.; TORRES, D.; ROCHA, C.; TEIXEIRA, J. A. Preparation of ingredients containing an ACE-inhibitory peptide by tryptic hydrolysis of whey protein concentrates. **International Dairy Journal**, Barking, v.17, n.5, p.481-487, 2007.
- FRENHANI, P. B.; BURINI, R. B. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos: controle e implicações na dietoterapia humana. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v.36, n.4, p.227-237, 1999.
- GUO, Y.; PAN, D.; TANOKURA, M. Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology. **Food Chemistry**, Londres, v.114, p.328-333, 2009.
- GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.59, p.15-32, 2002.
- HA, E.; ZEMEL, M. B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Lexington, v.14, n.5, p.251-258, 2003.
- HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, Londres, v.18, n.2, p.163-169, 2007.
- HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RECIO, I.; RAMOS, M.; AMIGO, L. Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. **International Dairy Journal**, Barking, v.12, p.805-812, 2002.
- JIANG, J.; CHEN, S.; REN, F.; LUO, Z.; ZENG, S.S. Yak Milk Casein as a functional ingredient: Preparation and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.74, p.18-25, 2007.
- LEE, J.-S.; YOO, M.A.; KOO, S.H.; BAEK, H.-H.; LEE, H.G. Antioxidant and ACE inhibitory activities of soybean hydrolysates: effect of enzyme and degree of hydrolysis. **Food Science and Biotechnology**, Seul, v.17, n.4, p.873-877, 2008.
- LI, G.H.; LE, G.W.; LIU, H.; SHI, Y.H. Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. **Food Science and Technology International**, Londres, v.11, n.4, p.281-287, 2005.
- LÓPEZ-FANDIÑO, R.; OTTE, J.; VAN CAMP, J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. **International Dairy Journal**, Barking, v.16, p.1277-1293, 2006.
- MIGUEL, M.; MANSO, M. A.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M. Vascular effects and antihypertensive properties of k-casein macropeptide. **International Dairy Journal**, Barking, v.17, n.12, p.1473-1477, 2007.
- MIRA, N. V. M.; MARQUEZ, U. M. L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.34, n.1, p.86-96, 2000.
- MORENO-INDIAS, I.; CASTRO, N.; MORALES-DELANUEZ, A.; SÁNCHEZ-MACÍAS, D.; ASSUNÇÃO, P.; CAPOTE, J.; ARGÜELLO, A. Farm and factory production of goat cheese whey results in distinct chemical composition. **Journal of Dairy Science**, St. Champaign, v.92, n.10, p. 4792-4796, 2009. Doi: 10.3168/jds.2009-2215.
- MULLALLY, M. M.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. **International Dairy Journal**, Barking, v.7, p.299-303, 1997.
- OHATA, S.M.; ZACARCHENCO, P.B.; AULER, F.; ANTUNES, A.J. Adição de concentrado protéico de soro (CPS) em mousse de maracujá. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Guarapuava, v.7, n.1, p.53-66, 2005.
- OTTE, J.; SHALABY, S.M.A.; ZAKORA, M.; NIELSEN, M.S. Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. **International Dairy Journal**, Barking, v.17, p.1460-1472, 2007.
- PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; LQARI, H.; GIRÓN-CALLE, J.; VIOQUE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F. Production and characterization of casein hydrolysates with a high amino acid Fischer's ratio using immobilized proteases. **International Dairy Journal**, Barking, v.14, n.6, p.527-533, 2004.
- PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides.

- Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v.11, n.9-10, p.347-356, 2001.
- PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; ROKKA, T.; KORHONEM, H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. **International Dairy Journal**, Barking, v.8, n.4, p.325-331, 1998.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14.ed. Piracicaba: ESALQ 2000. 477 p.
- RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. **Food Chemistry**, Londres, v.117, p.582-588, 2009.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Nova Iorque, v.62, n.3, p.597-635, 1998.
- RAWLINGS, N. D.; BARRET, A. J.; BATEMAN, A. Merops: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.38, p.227-233, 2010.
- SAINT-SAUVEUR, D.; GAUTHIER, S. F.; BOUTIN, Y.; MONTONI, A. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. **International Dairy Journal**, Barking, v.18, n.3, p.260-270, 2008.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.17, n.4, p.397-409, 2004.
- SILVA, M. R. **Obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite com alto teor de oligopeptídeos e elevada atividade inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina, utilizando a pancreatina e a papaína**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2010. 88 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- SILVA, S. V.; MALCATA, F. X. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal**, Barking, v.15, n.1, p.1-15, 2005.
- TORRUCO-UCO, J.; CHEL-GUERRERO, L.; MARTÍNEZ-AYALA, A.; DÁVILA-ORTÍZ, G.; BETANCUR-ANCONA, D. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. **Food Science & Technology**, Londres, v.42, p.1597-1604, 2009.
- TSAI, J. S.; CHEN, T. J.; PAN, B. S.; GONG, S. D.; CHUNG, M. Y. Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. **Food Chemistry**, Londres, v.106, p.552-558, 2008.
- VAN DER VEN, C.; GRUPPENB, H.; BONT, D. B. A.; VORAGEN, A. G. J. Optimisation of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 10, p. 813-820, 2002.
- WANG, L.; MAO, X.; CHENG, X.; XIONG, X.; REN, F. Effect of enzyme type and hydrolysis conditions on the in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and ash content of hydrolysed whey protein isolate. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.45, p.807-812, 2010.
- WANG, W.; MEJIA, E. G. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v.4, n.4, p.63-78, 2005.
- WU, J.; ALUKO, R. E.; MUIR, A. D. Improved method for direct highperformance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.950, p.125-130, 2002.
- YU, Y.; HUA, J.; MIYAGUCHI, Y.; BAI, X.; DUA, Y.; LIN, B. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from porcine hemoglobin. **Peptides**, Baton Rouge, v.27, n.11, p.2950-2956, 2006.