

Avaliação de atributos de sabor de peptídeos obtidos do soro e leite em reator enzimático de membrana

RESUMO

A proposta deste trabalho foi desenvolver um processo para obtenção de peptídeos de baixo peso molecular a partir de um concentrado proteico de soro de leite através de um processo combinado de hidrólise enzimática e filtração com membranas. Para isso, o substrato foi submetido a ação da enzima Alcalase[®] 2.4L em um Reator Enzimático de Membrana (REM) com membrana de 5 kDa, e o volume retido no reator ao final do processo foi submetido a ação da enzima Flavourzyme[®] 1000L em reator batelada. O primeiro processo manteve-se estável por 14 horas alcançando grau de hidrólise de 22% e resultando em peptídeos com massa molecular entre 400 e 3400 Da aproximadamente. A hidrólise sequencial resultou em peptídeos com massa molecular entre 80 e 1800 Da aproximadamente. Os peptídeos foram avaliados quanto aos atributos de sabores. Com a Hidrólise, a tendência é ficar amargo o sabor. A hidrólise combinada com REM é uma opção viável para obtenção de peptídeos com melhor perfil sensorial para aplicação em alimentos: menos amargor e mais umami. Além disso, o alto grau de hidrólise contribui com a percepção do sabor salgado.

INTRODUÇÃO

As proteínas em geral podem ter peptídeos criptografados em sua estrutura, que são liberados, absorvidos e transportados para os órgãos através da digestão, atuando em diversas vias metabólicas específicas, contribuindo positivamente para a saúde e assim também sendo chamados de biopeptídeos^{1,2,3}.

Entre as diversas funções biológicas, os biopeptídeos podem ter ação antiinflamatória, antidiabética⁴ e principalmente, diminuição do estresse oxidativo (antioxidante)⁵. A origem do estresse oxidativo vem do metabolismo de carboidratos celulares para produção de energia na forma de ATP⁶

As espécies reativas mais populares são peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxílico (OH[•]), ânion de superóxido (O₂⁻) e ácido hipocloroso (HOCl)⁷. A inflamação nas células β pancreáticas, causada pelo estresse oxidativo, como o HOCl[•], é identificada como a principal patogênese do desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2⁸.

Com o processo de hidrólise proteica, a tendência é tornar o alimento mais amargo⁹. No entanto, colocamos em questão quanto a influência da ação combinada de enzimas com mecanismo endoprotease (Alcalase) e Exoprotease (Flavourzyme) em um Reator enzimático de membrana (REM) alterar os atributos de sabor, melhorando por exemplo o sabor amargo dos peptídeos.

OBJETIVO

Obter peptídeos do soro de leite e desenvolver conhecimento teórico metodológico sobre influência da hidrólise no sabor.

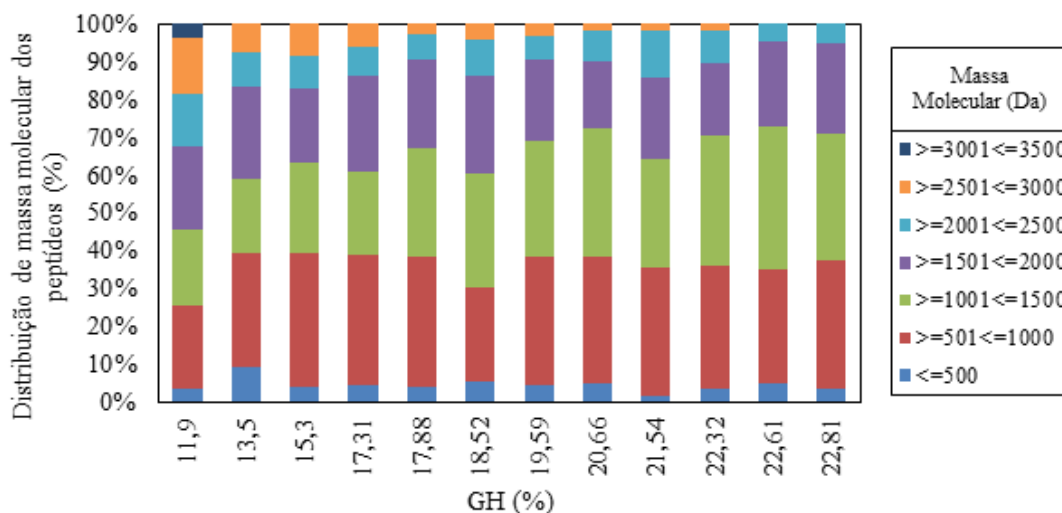
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Hidrolisar e fracionar os peptídeos por ultrafiltração.
- b) Avaliar os atributos de Sabor

RESULTADO E DISCUSSÃO (LETRA MAIÚSCULA NEGRITO)

A Figura 1 mostra a distribuição de massas moleculares dos peptídeos (relação massa por carga – m/z) em relação ao grau de hidrólise durante a operação do REM.

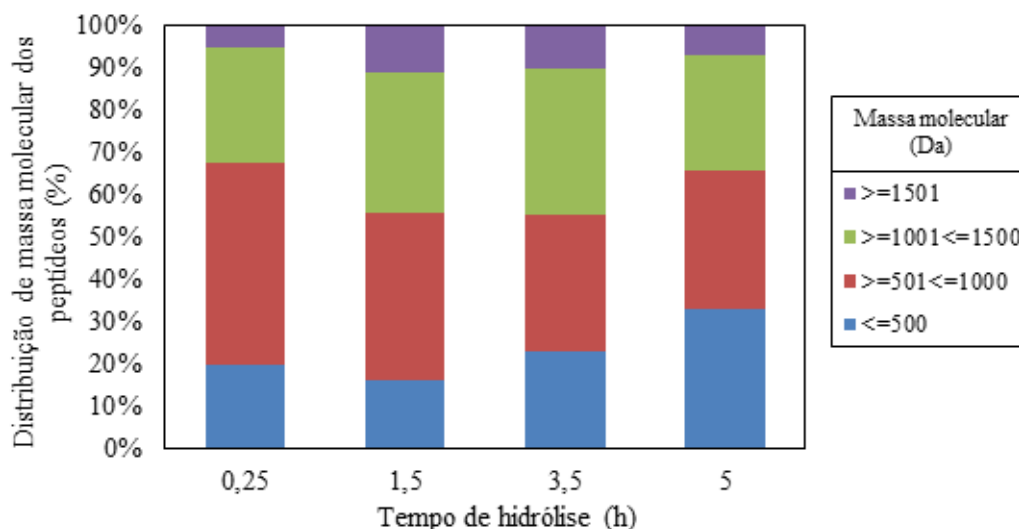
Figura 1. Distribuição de massas moleculares dos peptídeos do permeado em função do Grau de Hidrólise com enzima Alcalase.



Apresentar neste campo os resultados e discussão com referência citada por ordem numérica de aparecimento (1). O texto pode conter chamadas para Tabelas (Tabela X) ou para Figuras, que podem ser imagens ou gráficos (Figura X). As chamadas devem ser autoexplicativas, de forma que não haja a necessidade de o leitor consultar o texto para entender do que se trata.

Após hidrólise com a alcalase em REM, foi adicionado a enzima Flavourzyme por mais 5 horas de reação, em um intervalo de massas de até 5000 Da, no entanto, não houve detecção acima de 2000 Da. A Figura 2 mostra a distribuição das massas moleculares dos peptídeos obtidos pelo tratamento do volume retido no REM em relação ao tempo de hidrólise. Nessa etapa o GH não pôde ser medido neste processo.

Figura 2. Distribuição molecular dos peptídeos gerados a partir da hidrólise do volume retido no REM com Alcalase e Flavourzyme.



A medida que o processo avança Figura 2, aumenta a proporção de peptídeos de menor peso molecular (<500 Da) e aminoácidos livres. Ao final do processo, após 5 horas de operação, a proporção de peptídeos detectados nos intervalos de <500 Da, entre 501 e 100 Da e entre 1001 e 1500 Da são praticamente equivalentes (33, 32 e 28%, respectivamente). No entanto, embora as proporções sejam parecidas (número de peptídeos detectados), pela intensidade dos picos observados nos espectros m/z (dados não apresentados) a maior concentração de peptídeos está na faixa de até 500 Da, resultado da presença de aminoácidos livres e pequenos peptídeos.

AVALIAÇÃO DO AMARGOR E OUTROS ATRIBUTOS DE SABOR DOS PEPTÍDEOS

A L-Leucina foi utilizada como referência para a avaliação do amargor dos peptídeos gerados no REM, pela ação da Alcalase®(amostras codificadas como 31x, onde x indica o número da amostra, coletada em diferentes GH), e na hidrólise do volume retido no REM pela ação da Flavourzyme®(amostras codificadas como 32x, onde x indica o número da amostra, coletada em diferentes tempos de processo). A relação entre os códigos e o grau de hidrólise ou tempo de cada processo é mostrada no Quadro 1.

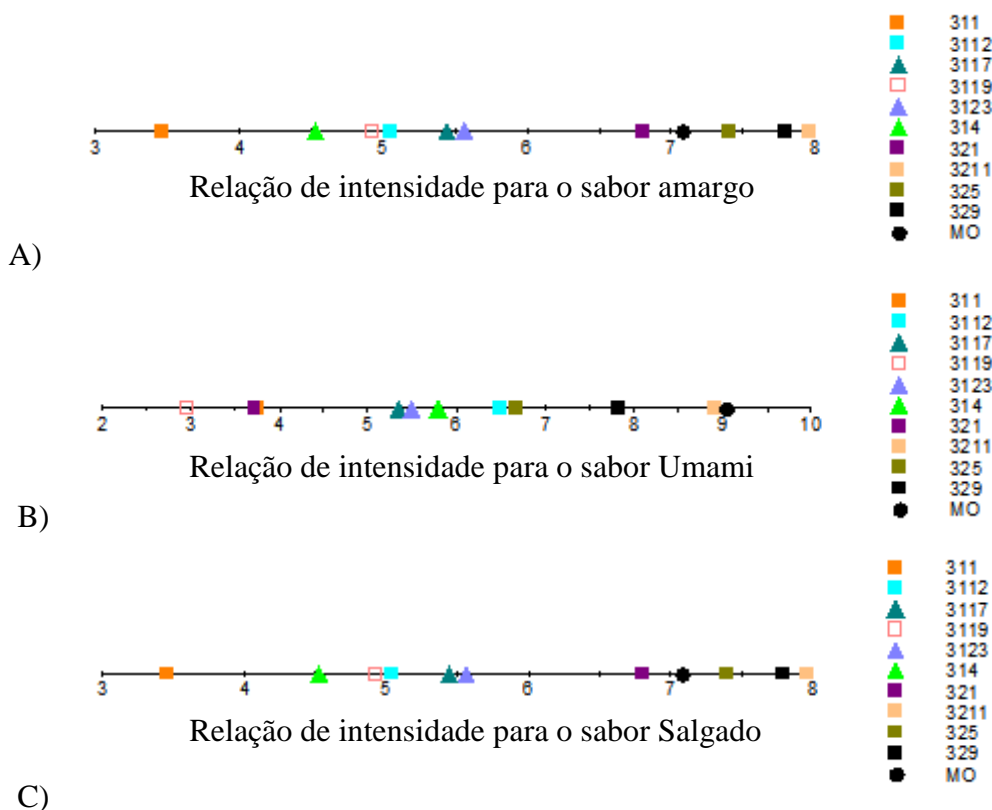
Quadro 1. Codificação das amostras para análise na língua eletrônica.

Amostras obtidas no REM pela ação da Alcalase®	Código da amostra	GH correspondente (%)
	311	11,9
	314	15,3
	3112	20,2
	3119	22,32
	3123	22,81
Amostras obtidas ação da Flavourzyme®	Código da amostra	Tempo de processo (h)
	321	0,25
	325	1,5
	329	3,5
	3211	5

Foi realizada análise de componente principal por amostra e por grupo de enzima. Na avaliação por amostras foi possível identificar que os peptídeos produzidos pela ação da Alcalase®(311 a 3123) são diferentes dos produzidos pela ação consecutiva da Flavourzyme®(321 a 3211) pois foram posicionados em eixos diferentes, com índice de discriminação igual a 3. Todas as amostras obtidas pela enzima 1 – Alcalase® (E1) e as amostras obtidas pela ação da enzima 2 – Flavourzyme®(E2), foram agrupadas em grupos diferentes, com índice de discriminação de 21.

Como houve comportamento linear $R^2 = 0,9728$ no coeficiente de correlação dos pontos da curva de adição, os resultados indica que o equipamento mostrou alta sensibilidade para a detecção de componente amargo em uma mistura complexa de peptídeos, podendo ser aplicado para avaliar o amargor das amostras. Desta maneira, as amostras dos hidrolisados foram avaliadas qualitativamente quanto ao seu amargor, conforme mostra a Figura 3.

Figura 3. Relação de Intensidade do sabor A)amargo; B)umami; C) salgado das amostra.



A amostra 3211 Figura 3A, que representa a amostra coletada na 5ª hora ao final do processo de hidrólise com a enzima Flavourzyme®, ou seja, com o maior GH, é a menos amarga, seguida pela 329, que é menos amarga que a 325. Numa escala de amargor, em ordem decrescente, ter-se-ia: 325 > 329 > 3211. Curiosamente, a amostra 321, que representa a amostra coletada no primeiro ¼ de hora, foi posicionada pouco à esquerda da matriz.

As amostras com intensidade relativa menor à matriz Figura 2ª (311 a 3123 e 321) contêm pouco ou não contêm leucina na forma livre, dada a ação da enzima Alcalase®, como endopeptidase, de não produzir aminoácidos livres. No entanto, quanto mais próximo da matriz elas estejam posicionadas, quer dizer que o equipamento pôde detectar maior semelhança entre elas (3123 mais próximo que 311).

As amostras resultantes da primeira parte do processo, especialmente, não mostraram uma tendência de comportamento. A amostra 3211 Figura 3B, que foi a última amostra coletada na segunda etapa do processo, após 5 horas de hidrólise, é a mais umami, ocupando quase a mesma posição da matriz.

A amostra 311 Figura 3C é a amostra menos salgada, enquanto a amostra 3211 é a mais salgada, ou seja, quanto maior o grau de hidrólise dos peptídeos, maior a percepção salgada nas amostras. Cheung et al⁹ também demonstraram que o tratamento com exopeptidases influenciou em outros atributos de sabor dos hidrolisados além do amargor e aumentou a aceitabilidade geral das amostras pelo painel sensorial.

CONCLUSÃO

Os reatores enzimáticos representam uma opção viável para o processamento do soro de queijo. A combinação da proteólise enzimática com a tecnologia de membranas permite a obtenção de peptídeos dentro de uma faixa de massa molecular de interesse, que exibem atividades biológicas além de possuírem alto valor nutricional, sendo assim uma forma bastante promissora de valoração das proteínas do soro.

A combinação dos processos permitiu a obtenção de peptídeos com perfis diferentes, que podem ser direcionados para diferentes necessidades, como alimentação de alta absorção para atletas e idosos, para o caso dos peptídeos maiores, obtidos na primeira etapa do processo, e para formulação de alimentos infantis hipoalergênicos, e até mesmo como flavorizantes, no caso dos peptídeos obtidos na segunda etapa do processo, entre outros usos; e mais especificamente, permitiu a obtenção de peptídeos com maior potencial antioxidante, menor amargor.

Concluimos que a hidrólise sequencial aliada ao REM se torna uma opção viável para obtenção de peptídeos com melhor perfil sensorial para aplicação em alimentos: menos amargo, mais umami e o alto GH contribui com a percepção do sabor salgado.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Ciccaglione, A. F.; Giulio, M. D.; Lodovico, S. D.; Campli, E. D.; Cellini, L.; Marzio, L. Bovine lactoferrin enhances the efficacy of levofloxacin-based triple therapy as first-line treatment of *Helicobacter pylori* infection: an in vitro and in vivo study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2019, v.74, p.1069–1077.
2. Lacroix, I. M. E.; Meng, G.; Cheung, I. W. Y.; Li Chan, E. C. Y. Do Whey protein-derived peptides have dual dipeptidyl-peptidase IV and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities? **Journal of Functional Foods**, 2016, v.21, p.87-96.
3. Li, S., Tingting, B.; Zheng, J.; Liu, L.; He, G.; Wu, J. Preparation, bioavailability, and mechanism of emerging activities of ile-pro-pro and val-pro-pro. **Journal of functional foods**, 2019, v.18, p.1097-1110.
4. Mohamed, W. A.; Schaalán, M. F. “Antidiabetic efficacy of lactoferrin in type 2 diabetic pediatrics; controlling impact on PPAR- γ , SIRT-1, and TLR4 downstream signaling pathway. **Diabetology & metabolic syndrome**, 2018, v.10, p.89.
5. Nielsen, S. D.; Beverly, R. L.; Qu, Y.; Dallas, D. C. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database. **Food Chemistry**, 2017, v.232, p.673-682.
6. Oyedemi, S. O.; Oyedemi, B. O.; Ijeh, I. I.; Ohanyerem, P. E.; Cooposamy, R. M.; Aiyegoro, O. A. Alpha-Amylase Inhibition and Antioxidative Capacity of Some Antidiabetic Plants Used by the Traditional Healers in Southeastern Nigeria. **The Sci. World J. Hindawi**, 2017.
7. Hare, J. M.; Beigi, F.; Tziomalos, K. Nitric oxide and cardiobiology-methods for intact hearts and isolated myocytes. **Methods in Enzymology**, 2008, v.441, p.369-392.
8. HANCHANG, W; KHAMCHAN, A; WONGMANEE, N; SEEDADEE, C. Hesperidin ameliorates pancreatic β -cell dysfunction and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rat model. **Life Sciences**, 2019, 116858.
9. CHEUNG, I. W. Y.; CHEUNG, L. K. Y.; TAN, N. Y.; LI-CHAN, E. C. Y. The role of molecular size in antioxidant activity of peptide fractions from Pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1297-1306, 2012.