

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**DE ALIMENTOS**

**Kátia Joana Verdi**

**Produção e caracterização de peptídeos de soro de leite em reator  
enzimático de membrana utilizando hidrólise sequencial**

**Passo Fundo**

**2017**



**Kátia Joana Verdi**  
**Engenheira Química**

**Produção e caracterização de peptídeos de soro de leite em reator  
enzimático de membrana utilizando hidrólise sequencial**

Dissertação de Mestrado apresentada para  
obtenção do título de Mestre em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos  
Orientador: Dr. Vandr  Barbossa Brião  
Co-orientador: Christian Oliveira Reinehr  
Linha de pesquisa: Processos biotecnológicos e  
não convencionais na produção de alimentos e  
ingredientes

**Passo Fundo**

**2017**



**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

Produção e caracterização de peptídeos de soro de leite em reator enzimático de membrana utilizando hidrólise sequencial

Elaborada por  
**Kátia Joana Verdi**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

**Comissão Examinadora  
Passo Fundo, RS, Brasil**

*Vandré*

**Vandré Barbosa  
Brião, Dr., UPF  
(Orientador/Presidente)**

**Christian Oliveira Reinehr, (Coorientador) Dr., UPF**

**Maria Tereza Friedrich, Dra., UPF**

**Carlos Prentice Hernández, Dr., FURG**

CIP – Catalogação na Publicação

---

V484p Verdi, Kátia Joana

Produção e caracterização de peptídeos de soro de leite em reator enzimático de membrana utilizando hidrólise sequencial / Kátia Joana Verdi. – 2017.

161 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Vandr e Barbosa Brião.

Coorientador: Prof. Dr. Christian Oliveira Reinehr.

Disserta o (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2017.

---

Cataloga o: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

## **AGRADECIMENTOS**

Para o sucesso do projeto é preciso dedicação e empenho extra daquele que o idealiza, ou seja, do autor. Mas para tanto entusiasmo do pesquisador há que se ter suporte e inspiração. Por isso nunca estive sozinha e sou grata ao SENAI por ser âncora e incentivador, aos amigos e à família porque me nutriram daquilo que eu precisava para me manter motivada, aos professores pela orientação e aos colegas pela prazerosa companhia.





*A raiz de uma equação é um algarismo que, substituindo a incógnita, faz da equação uma identidade. Diz-se que a raiz satisfaz a equação.*

*Para solucionar uma equação, deve-se determinar todas as suas raízes. Quando uma equação é satisfeita por todos os valores imagináveis das incógnitas, fala-se em identidade.  $(a+b)^2=a^2+2ab+b^2$ . (LARSSON, 2006).*



## RESUMO

O soro de leite é um subproduto abundante do processamento de queijos reconhecido como um composto de alto valor nutricional. As proteínas do soro de leite são fonte de aminoácidos cujas propriedades biológicas essenciais para o organismo humano manifestam-se após a clivagem das ligações peptídicas. A proposta deste trabalho foi desenvolver um processo para obtenção de peptídeos de baixa massa 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 à ação da enzima Alcalase<sup>®</sup> 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 à ação da enzima Flavourzyme<sup>®</sup> 1000L em reator batelada. O primeiro processo manteve-se estável por 14 horas alcançando grau de hidrólise de 22% e conversão de 69,47%, 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, com atividade antioxidante 16 vezes superior aos obtidos na primeira hidrólise e menos amargos. A combinação dos dois processos permitiu a recuperação de 100% da carga proteica alimentada.

Palavras-chave: Biopeptídeos. Hidrólise Sequencial. Massa Molecular



## ABSTRACT

Whey is an abundant by-product of cheese processing recognized as a compound of high nutritional value. Whey proteins are a source of amino acids whose biological properties essential for the human body manifest themselves after the cleavage of the peptide bonds. The purpose of this work was to develop a process for obtaining low molecular mass peptides from whey protein concentrate through a combined enzymatic hydrolysis and membrane filtration process. For this, the substrate was subjected to the action of the enzyme Alcalase® 2.4L in an Enzymatic Membrane Reactor (EMR) equipped with 5 kDa membrane, and the volume retained in the reactor at the end of the process was subjected to the action of the enzyme Flavourzyme® 1000L in a batch reactor. The first process was stable for 14 hours reaching a degree of hydrolysis of 22% and conversion of 69.47%, resulting in peptides with molecular mass between 400 and 3400 Da, approximately. Sequential hydrolysis resulted in peptides with molecular mass between 80 and 1800 Da, with antioxidant activity 16 times higher than those obtained in the first hydrolysis and also less bitter. The combination of the two processes allowed the recovery of 100% of the protein fed.

Key-words: Biopeptides. Sequential Hydrolysis. Molecular Mass

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mecanismo de hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por protease. ....	37
Figura 2. Mecanismos de ação de enzimas endo e exoproteolíticas. ....	39
Figura 3. Características de processos que utilizam diferença de pressão como força motriz. ....	40
Figura 4. Configuração do CSTMRBR. ....	44
Figura 5. Fluxograma do processo de obtenção do concentrado proteico de soro de leite desenvolvido no Laboratório de Operações Unitárias da UPF utilizado como matéria-prima para a hidrólise. ....	47
Figura 6. Esquema de operação do Reator Enzimático de Membrana em fluxo contínuo com reciclo da solução proteica não permeada. ....	48
Figura 7. Língua eletrônica $\alpha$ -Astree. ....	58
Figura 8. Permeabilidade da membrana de ultrafiltração de 5 kDa com água a 25°C (•) e 55°C (▪). ....	59
Figura 9. Fluxo de permeado em relação à pressão para solução proteica de CPS (50 g/L) a 55°C, utilizando membrana de ultrafiltração de 5 kDa. ....	60
Figura 10. Avanço do grau de hidrólise das proteínas do CPS utilizando a enzima Alcalase® 2.4L no REM. ....	61
Figura 11. Evolução do fluxo de permeado no REM ao longo de 14 horas de operação contínua com hidrólise e separação de peptídeos. ....	63
Figura 12. Resistência total durante a ultrafiltração da solução hidrolisada no REM. ....	65
Figura 13. Permeabilidade da membrana com água a 55°C após enxágue para remoção de depósitos devido à polarização por concentração. ....	66
Figura 14. Contribuição de cada tipo de resistência imposta ao fluxo de permeado no REM, considerando a resistência imposta pela membrana, a resistência devido à incrustação (irreversível) e a resistência devido a polarização por concentração (reversível). ....	67
Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura da membrana utilizada no REM após ultrafiltração e enxágue: a) vista da superfície da membrana após o uso; b) vista inferior da membrana após o uso; c) vista da seção transversal (fratura) da membrana após o uso. ....	68
Figura 16. Evolução da conversão no REM. ....	69
Figura 17. Recuperação proteica no REM. ....	70
Figura 18. Perfil eletroforético das proteínas padrão (2-250 kDa) e do CPS sem hidrólise em gel Tris-Tricina. ....	73

Figura 19. Distribuição das massas dos peptídeos coletados no permeado do REM durante as 14 horas de operação. ....	75
Figura 20. Distribuição de massas moleculares dos peptídeos do permeado em função do Grau de Hidrólise. ....	76
Figura 21. Distribuição das massas das proteínas e peptídeos na solução proteica retida no REM ao final do processo. ....	77
Figura 22. Distribuição molecular dos peptídeos gerados a partir da hidrólise do volume retido no REM com exoprotease.....	78
Figura 23. Atividade antioxidante dos peptídeos coletados no permeado do Rem de acordo com o Grau de Hidrólise. ....	80
Figura 24. Atividade antioxidante de peptídeos obtidos pela hidrólise do volume retido no REM com a Flavourzyme®. ....	81
Figura 25. Análise de Componente principal nas amostras de hidrolisados obtidos no REM pela ação da Alcalase® e na hidrólise do volume retido do REM pela ação da Flavourzyme® - índice de discriminação igual a 3. ....	85
Figura 26. Análise de Componente principal nas amostras de hidrolisados obtidos no REM pela ação da Alcalase® e na hidrólise do volume retido do REM pela ação da Flavourzyme® - índice de discriminação igual a 21. ....	85
Figura 27. Análise discriminante das amostras. ....	86
Figura 28. Análise de componente principal nos pontos da curva de adição de L-leucina.....	87
Figura 29. Análise discriminante dos pontos da curva de adição.....	87
Figura 30. Coeficiente de correlação dos pontos da curva de adição de L-leucina.....	88
Figura 31. Intensidade relativa do sabor amargo das amostras obtidas no permeado do REM e na hidrólise do volume retido no REM. ....	88
Figura 32. Intensidade relativa do sabor Umami das amostras obtidas no permeado do REM e na hidrólise do volume retido no REM. ....	90
Figura 33. Intensidade do sabor salgado das amostras obtidas no permeado do REM e na hidrólise do volume retido no REM. ....	91





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração das proteínas do soro de leite e respectiva massa molar.....	30
Tabela 2. Comparação do conteúdo de aminoácidos do soro de leite com o padrão FAO. ....	30
Tabela 3. Composição do concentrado proteico de soro de leite em pó obtido por processo de <i>spray dryer</i> .....	46
Tabela 4. Resistências associadas ao fluxo de permeado durante operação do REM.....	66
Tabela 5. Caracterização molecular do hidrolisado obtido no REM.....	72



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- A – Área de filtração da membrana
- CMC – comprimento médio da cadeia
- CPS – Concentrado Proteico de Soro de Leite
- DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio
- DQO – Demanda Química de Oxigênio
- FAO – Organização da Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
- $F_p$  – Fluxo de permeado
- GH – Grau de Hidrólise
- $h_T$  – número total de ligações peptídicas
- Ig – Imunoglobulinas
- $k_w$  – Produto iônico da água
- $L_p$  – Permeabilidade hidráulica
- LF – Lactoferrina
- MB – Número de mols de base
- MEV – Microscópio eletrônico de varredura.
- MF – Microfiltração
- MMM – Massa molecular média
- $N_a$  – Concentração de nitrogênio na alimentação
- $NNP_a$  – Concentração de nitrogênio não proteico na alimentação
- $N_p$  – Concentração de nitrogênio no permeado
- OR – Osmose Reversa
- Phe – Fenilalanina
- Q – Vazão de permeado
- PSM – Processo de Separação por Membranas
- $R_t$  – Resistência total imposta ao fluxo
- REM – Reator enzimático de Membrana
- RP – Recuperação proteica
- $R_m$  – Resistência imposta pela membrana
- $R_i$  – Resistência devido a incrustação
- $R_p$  – Resistência devido a polarização por concentração
- SAB – Soro Albumina Bovina

SDS – Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil sulfato de sódio)  
SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Dodecil sulfato de sódio- eletroforese em gel de poliacrilamida)  
 $S_F$  – Concentração do substrato  
 $t$  – Tempo de obtenção de permeado  
UF – Ultrafiltração  
UPF – Universidade de Passo Fundo  
 $V_P$  – Volume de permeado acumulado  
 $V_R$  – Volume de reação  
WHO – Organização mundial da saúde  
X – Conversão  
 $\beta$ -Lg –  $\beta$ -Lactoglobulina  
 $\alpha$  – Grau de dissociação  
 $\alpha$ -La –  $\alpha$ -Lactalbumina  
 $\mu$  - Viscosidade do fluido  
 $\Delta P$  – Pressão transmembrana  
Ala – Alanina  
Arg – Arginina  
Asn – Asparagina  
Asp – Aspartato  
Cys – Cisteína  
Gln – Glutamina  
Glu – Ácido glutâmico  
Gly – Glicina  
His – Histidina  
Ile – Isoleucina  
Leu – Leucina  
Lys – Lisina  
Met – Metionina  
Phe – Fenilalanina  
Pro – Prolina  
Ser – Serina  
Thr – Treonina  
Trp – Triptófano

Tyr – Tirosina

Val – Valina



## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>SORO DE LEITE BOVINO</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2</b>	<b>AS PROTEÍNAS DO SORO</b> .....	<b>29</b>
<b>2.3</b>	<b>PEPTÍDEOS BIOATIVOS</b> .....	<b>32</b>
2.3.1	Atividade antioxidante de peptídeos .....	34
<b>2.4</b>	<b>HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO SORO</b> .....	<b>35</b>
2.4.1	Hidrólise de proteínas.....	35
2.4.2	Mecanismo de hidrólise.....	36
2.4.3	Grau de hidrólise .....	37
2.4.4	Amargor de peptídeos .....	38
<b>2.5</b>	<b>ULTRAFILTRAÇÃO DOS HIDROLISADOS PROTEICOS</b> .....	<b>39</b>
2.5.1	Fluxo e permeabilidade .....	41
2.5.2	A UF aplicada à separação de hidrolisados de soro .....	42
<b>2.6</b>	<b>REATOR ENZIMÁTICO DE MEMBRANA</b> .....	<b>43</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>OBTENÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE</b> .....	<b>46</b>
<b>3.2</b>	<b>OPERAÇÃO DO REATOR ENZIMÁTICO DE MEMBRANA</b> .....	<b>47</b>
3.2.1	Caracterização inicial da membrana.....	49
3.2.2	Hidrólise e ultrafiltração do hidrolisado de soro .....	49
3.2.3	Análise de resistências.....	50
3.2.4	Tratamento da solução proteica retida no REM com exoprotease .....	52
<b>3.3</b>	<b>MÉTODOS ANALÍTICOS</b> .....	<b>52</b>
3.3.1	Teor de proteína e nitrogênio .....	52
3.3.2	Grau de hidrólise .....	52
3.3.3	Conversão no REM .....	53
3.3.4	Recuperação proteica no REM.....	54
3.3.5	Caracterização dos peptídeos .....	54
3.3.5.1	<i>Comprimento médio da cadeia e da massa molecular média dos peptídeos</i> .....	<i>54</i>
3.3.5.2	<i>Eletroforese em gel</i> .....	<i>55</i>
3.3.5.3	<i>Distribuição da massa molecular dos peptídeos por MALDI-TOF</i> .....	<i>56</i>

3.3.5.4	<i>Atividade Antioxidante dos peptídeos</i> .....	56
3.3.5.5	<i>Avaliação dos atributos de sabor dos peptídeos</i> .....	57
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA</b> .....	<b>59</b>
4.1.1	Fluxo de permeado para a água e para a solução proteica .....	59
<b>4.2</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO NO BIORREATOR À MEMBRANA</b> .	<b>61</b>
4.2.1	Grau de hidrólise .....	61
4.2.2	Fluxo de permeado no REM .....	63
4.2.3	Resistências ao fluxo no REM .....	65
4.2.4	Avaliação do processo.....	68
<b>4.3</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS HIDROLISADOS</b> .....	<b>71</b>
4.3.1	Cálculo do comprimento médio da cadeia e da massa molecular média .....	71
4.3.2	Perfil de massa molecular dos peptídeos.....	72
4.3.2.1	<i>Eletroforese</i> .....	72
4.3.2.2	<i>Distribuição de massa molecular dos peptídeos obtidos no REM</i> .....	74
4.3.2.3	<i>Distribuição de massa molecular de peptídeos obtidos no tratamento da solução proteica retida do REM com exoprotease</i> .....	77
<b>4.4</b>	<b>ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PEPTÍDEOS</b> .....	<b>79</b>
<b>4.5</b>	<b>AVALIAÇÃO DO AMARGOR E OUTROS ATRIBUTOS DE SABOR DOS PEPTÍDEOS</b> .....	<b>83</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>93</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>97</b>
	<b>APÊNDICE A: PROCEDIMENTO DE LIMPEZA DA MEMBRANA.</b> ..	<b>105</b>
	<b>APÊNDICE B: ESPECTROS COM PERFIL M/Z DAS AMOSTRAS DE HIDROLISADO PERMEADO</b> .....	<b>106</b>
	<b>APÊNDICE C. DISTRIBUIÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES DOS PEPTÍDEOS RECUPERADOS NO PERMEADO DO REM</b> .....	<b>124</b>
	<b>APÊNDICE D. ESPECTROS M/Z OBTIDOS A PARTIR DA HIDRÓLISE DO VOLUME RETIDO NO REM COM A FLAVOURZYME®</b> .....	<b>127</b>
	<b>APÊNDICE E. DISTRIBUIÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES DOS PEPTÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DA HIDRÓLISE DO VOLUME RETIDO NO REM COM A FLAVOURZYME®</b> .....	<b>131</b>



<b>APÊNDICE F. ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>135</b>
---	------------



## 1. INTRODUÇÃO

Na segunda metade do século passado, o mercado de lácteos iniciou um processo de reestruturação motivada pela implantação de legislações relacionadas à responsabilidade ambiental quanto ao descarte dos resíduos e pelas evidências de conhecimentos científicos e tecnológicos sobre os componentes do soro de leite. A partir de então, a evolução se deu no sentido de transformar um subproduto de baixo valor, como o soro era considerado, em uma matéria-prima valiosa (TORRES, 2005).

Nas três últimas décadas, foram desenvolvidos vários processos que permitem a obtenção de produtos com alto teor de proteínas nativas a partir do soro: os concentrados e os isolados de proteínas do soro, geralmente obtidos por filtração com membranas (PINTO, 2008). No entanto, a transformação do soro de leite em concentrado proteico ou isolado gera um grande fluxo de permeado contendo lactose e sais, que necessita de um processo posterior para uso ou para descarte (YADAV, et al. 2015; BALDASSO, 2011). Isto faz acreditar que o reaproveitamento do soro para um único produto não é muito rentável. Além disso, as proteínas isoladas podem ainda ser valoradas através de hidrólise enzimática para obtenção de frações de peptídeos não-alergênicos e peptídeos com atividade biológica específica, além do seu valor nutritivo. Assim, uma alternativa com viabilidade técnico-econômica para o processamento de soro de leite é a recuperação da fração de proteína e de permeado para obter diferentes produtos de maior valor comercial (YADAV, et al. 2015).

As proteínas presentes no concentrado proteico de soro de leite (CPS) são fonte de peptídeos biologicamente ativos, os quais são inativos enquanto presos na sequência original da proteína. Além disso, proteínas com estrutura globular compacta presentes no soro podem causar alergia pois as enzimas do sistema digestivo não chegam até os sítios de clivagem e assim não conseguem digeri-las. A hidrólise enzimática libera os peptídeos e diminui a alergenicidade por expor as cadeias, facilitando a sua digestão (CARLOS, 1997; KORHONEN; PIHLANTO, 2006).

Os biorreatores à membrana permitem operar processos que compreendam etapas de purificação, transformação e separação. O CPS, obtido a partir de um processo de purificação, pode ser submetido ao biorreator à membrana para hidrólise e separação de modo contínuo. O processo combinado de transformação e separação tende a diminuir os custos e dar agilidade ao processo produtivo. Uma das maiores vantagens é que esta configuração permite o reuso da enzima e facilita o controle do peso molecular dos produtos selecionando adequadamente o poro da membrana.

Poucos trabalhos científicos abordam o uso de biorreatores à membrana em fluxo contínuo para a produção de peptídeos. Para desenhar um processo viável é necessário elucidar variáveis como a pressão de operação, tida como crítica na separação de proteínas por membranas pois influencia no fenômeno de incrustação, o grau de hidrólise e a massa molecular dos peptídeos ao decorrer do processo, diretamente relacionado à redução da alergenicidade, à manutenção da atividade biológica e ao sabor amargo, aspectos que podem direcionar ou limitar o uso dos peptídeos de acordo com a funcionalidade desejada, como alimentação para atletas, para alérgicos, nutrição parenteral e suplementação.

Seguindo o conceito de refinaria de soro de leite onde a matéria-prima principal é decomposta em outros produtos de interesse, o Laboratório de Operações Unitárias da Universidade de Passo Fundo dispõe de uma planta multipropósito para processamento de soro de leite utilizando filtração com membranas. Dentro deste contexto, este trabalho dá sequência a estudos anteriores, nos quais um dos produtos obtidos foi um concentrado proteico de soro de leite.

A partir desta matéria-prima, pretende-se produzir peptídeos com alto valor biológico combinando etapas de hidrólise sequencial em processo contínuo e descontínuo, utilizando a ultrafiltração como técnica de separação do hidrolisado para uniformização do produto. Parâmetros relacionados à operação, como o fluxo de permeado, avanço do grau de hidrólise, conversão e recuperação proteica, e relacionados à natureza do produto, como atividade antioxidante, massa molecular e amargor, serão monitorados.

Este trabalho aborda a produção de peptídeos a partir de soro de leite por uma ótica contemporânea sobre o aproveitamento de resíduos da indústria de alimentos para fabricação de produtos de alto valor agregado, e apresenta um conceito inovador quanto ao processo de obtenção que combina hidrólise e separação, operando em modo contínuo e sequencial.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 SORO DE LEITE BOVINO

O soro de leite bovino, ou soro de queijo, é um subproduto abundante das indústrias queijeiras e apresenta alto conteúdo de matéria orgânica, devido a presença de lactose e proteínas, principalmente, responsáveis pelas altas tachas de Demanda Bioquímica (DBO) e Química de Oxigênio (DQO) que ficam em torno de 27-60 g/L e 50-102 g/L, respectivamente (AFONSO, 2008, YADAV, 2015). Dada a grande capacidade poluidora do soro os órgãos governamentais introduziram legislações à cerca do seu descarte.

Em paralelo com as restrições à disposição de soro de leite, o valor intrínseco dos componentes do soro do leite, particularmente as proteínas, foi sendo cada vez mais reconhecido (SMITHERS, 2015).

Nos últimos anos evidências científicas comprovaram diversas propriedades físicas, químicas, nutricionais e biológicas das proteínas do soro e este avanço da ciência estabeleceu seu valor como alimento. Paralelamente, tecnologias foram estudadas e desenvolvidas para o processamento do soro, e, com a demanda dos consumidores por alimentos mais nutritivos e promotores de saúde, estas tecnologias concentram-se hoje na manutenção das qualidades nutricionais e biológicas das proteínas do soro (SMITHERS, 2015).

### 2.2 AS PROTEÍNAS DO SORO

O valor nutricional do soro de leite está relacionado a qualidade de suas proteínas, que depende do padrão e concentração de aminoácidos essenciais. O soro contém aproximadamente 0,6-0,9 % de proteínas (CARDOSO, 2014; YADAV, 2015; PADILHA, 2007). Estas proteínas apresentam estrutura tipicamente globular, estabilizadas pelas pontes dissulfeto presentes, o que lhes conferem estabilidade estrutural, porém, são sensíveis à desnatura térmica e com isso podem ter suas propriedades funcionais alteradas.

Dentro deste percentual, a  $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) representa 49% da composição proteica do soro, seguida pela  $\alpha$ -Lactalbumina ( $\alpha$ -La) que representa 16%, as imunoglobulinas (Ig) que representam 10% e soro albumina bovina (SAB), com 5% (PINTO, 2008). As frações e o peso molecular de cada proteína é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração das proteínas do soro de leite e respectiva massa molar

Proteína	%	Peso Molecular (Da)
$\beta$ -Lactoglobulina	55-65	18.300
$\alpha$ -Lactoalbumina	15-25	14.200
Imunoglobulinas	10-15	80.000-900.000
Soro Albumina Bovina	5-6	66.300

Fonte: Adaptado de VIOTTO (1993) e HARAGUCHI et al. (2006).

As proteínas do soro do leite têm perfil de aminoácidos próximo aos padrões de necessidades recomendados pela FAO e por isso é uma excelente fonte de aminoácidos essenciais. A Tabela 2 apresenta uma comparação entre o conteúdo de aminoácidos presentes nas proteínas do soro de leite e o escore padrão mais atualizado da FAO, para adultos de 18 anos ou mais.

Tabela 2. Comparação do conteúdo de aminoácidos do soro de leite com o padrão FAO.

Aminoácido	Padrão FAO g/100g proteína	Proteína de Soro g/100g proteína
Histidina	1,5	2,1
Isoleucina	3,0	5,9
Leucina	5,9	9,6
Lisina	4,5	9,4
Metionina + cisteína (sulfurados)	2,2	4,1
Fenilalanina + tirosina (aromáticos)	3,8	5,9
Treonina	2,3	7,2
Triptofano	0,6	1,4
Valina	3,9	5,8

Fonte: WHO (2002); TORRES (2005).

As proteínas do soro possuem boa digestibilidade e são rapidamente absorvidas pelo organismo, o que as tornam muito adequadas para situações de estresses metabólicos em que a reposição de proteínas no organismo é emergencial. Comparado a outras proteínas alimentares, as do soro apresentam a maior concentração em aminoácidos de cadeia ramificada (isoleucina, leucina e valina), constituintes das proteínas musculares. Estudos relatam que a suplementação nutricional com este tipo de aminoácidos em desportistas previne a degradação proteica e a perda de massa muscular associada ao exercício intenso e de longa duração. Por isso, o valor biológico destas proteínas é alto quando comparado com outras proteínas alimentares (SGARBIERI, 2004; TORRES, 2005; ).

As proteínas que possuem estrutura globular compacta, como a  $\beta$ -lactoglobulina, podem apresentar característica alérgica pois tem sua digestão dificultada por falta de acesso da enzima aos sítios ativos específicos de clivagem (CARLOS, 1997). Dentro da estrutura globular a  $\beta$ -Lg possui grupos sulfídricos não reativos. Este grupo atribui propriedades importantes como a estabilidade do leite ao calor (BALDASSO, 2011).

Devido à abundância da  $\beta$ -Lg no soro de leite, as propriedades dos concentrados proteicos se devem, em grande parte, às propriedades da  $\beta$ -Lg (BALDASSO, 2011). As principais propriedades biológicas dos peptídeos derivados da  $\beta$ -Lg são: anti-hipertensiva, antioxidante, antimicrobiana, imunoestimulante e hipocolesterolêmico (SGARBIERI, 2004, MADUREIRA et al., 2010, HARAGUCHI et al., 2006).

A  $\alpha$ -Lactalbumina é uma metaloproteína com um átomo de cálcio que lhe possibilita a ligação com outras proteínas, e por isso tem tendência a se polimerizar. Esta propriedade a torna estável ao calor, pois o cálcio promove a formação de ligações iônicas intermoleculares, mantendo as moléculas próximas e aumentando a probabilidade de agregação no aquecimento (BALDASSO, 2011).

Em relação à composição aminoacídica, a  $\alpha$ -La apresenta escore químico elevado e os aminoácidos essenciais estão em elevada proporção, 63,2% dos aminoácidos totais. São eles: triptofano, fenilalanina+tirosina, leucina, isoleucina, treonina, metionina+cisteína, lisina e valina (BORGES, 2000). É, por isso, utilizada em alimentos proteicos para atletas pois é fonte de aminoácidos de cadeia ramificada.

A soro albumina bovina (SAB) está presente na circulação sanguínea, é a proteína mais abundante do soro bovino e é semelhante a molécula do soro sanguíneo humano. As albuminas são caracterizadas pelo baixo número de triptofano e metionina, alto número de cisteína e aminoácidos carregados, asparina e ácido glutâmico, lisina e arginina. Contém grupos dissulfeto e grupo sulfídrico livre, e por isso pode formar dímeros, principalmente em altas concentrações (FERREIRA, 2009; GALVÃO, 2004).

As imunoglobulinas são glicoproteínas, monômeros ou polímeros de uma molécula de quatro subunidades, ligadas por pontes dissulfetos. São conhecidas como anticorpos, e suas principais ações biológicas estão relacionadas a imunidade passiva e atividade antioxidante (BARBOSA, 2013).

### 2.3 PEPTÍDEOS BIOATIVOS

O termo peptídeos bioativos refere-se a peptídeos de origem animal ou vegetal que podem ter função regulatória no sistema humano além do seu valor nutritivo (HARTMANN; MEISEL, 2007). Os peptídeos bioativos são mais facilmente digeríveis do que a proteína intacta e cumprem funções nutritivas, farmacológicas e antienvhecimento (BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015).

Hidrolisados proteicos de soro têm sido estudados como ingredientes em formulações nutricionais para indivíduos com necessidades nutricionais específicas, como o caso de pessoas com alergias às proteínas do leite e fenilcetonúricos. A fenilcetonúria (PKU) é uma desordem metabólica genética caracterizada pela deficiência da enzima fenilalanina hidrolase que não tem cura e cujo tratamento consiste basicamente em seguir uma dieta isenta de fenilalanina (Phe). Os hidrolisados de proteínas de soro de leite com níveis reduzidos de (Phe) são uma alternativa para formulações para estes pacientes. Níveis de remoção de Phe entre 69 e 99% podem ser obtidos por processos sequenciais utilizando-se resinas adsorventes (NONGONIERMA, FITZGERALD, 2015).

Para o caso dos indivíduos que não conseguem digerir proteína intacta, na sua forma nativa, e alérgicos, a hidrólise diminui o potencial alergênico através da destruição dos epitopos alergênicos e aumenta a digestibilidade das proteínas (NONGONIERMA, FITZGERALD, 2015), por torná-las mais acessíveis à ação das enzimas gástricas. Uma enzima protease comercial, Protex 6L, foi utilizada para hidrolisar proteínas do soro de leite em um reator a membrana contínuo, resultando em uma redução da antigenicidade de 99,97% (GUADIX, CAMACHO, GUADIX, 2006).

Através da administração via oral, peptídeos bioativos podem afetar os principais sistemas do corpo humano, como o sistema cardiovascular, digestivo, endócrino, nervoso e imunológico. Por esta razão, o potencial de sequências específicas de biopeptídeos tem despertado crescente interesse científico e comercial durante a última década, como aliados para promover a saúde humana, reduzindo o risco de doenças crônicas ou aumentando a proteção imune natural (HARTMANN; MEISEL, 2007, KORHONEN, 2009).

Estudos citoquímicos mostram evidências de que peptídeos bioativos podem influenciar a viabilidade de células, como a proliferação. Juntas, as propriedades imunomoduladoras e citoquímicas podem contribuir para a atividade protetora de peptídeos ativando a resposta imune contra células tumorais (HARTMANN; MEISEL, 2007).



A maioria das proteínas do soro podem melhorar as funções imunológicas das células, através da proliferação de linfócitos, síntese de anticorpos e regulação de citocinas, e aumentar a imunidade da mucosa no trato gastrointestinal. Desta maneira, peptídeos com atividade imunomodulatória podem regular o desenvolvimento do sistema imune de recém nascidos (KORHONEN; PIHLANTO, 2006).

As proteínas do soro de leite foram identificadas como fonte de peptídeos inibidores da enzima de conversão da angiotensina, atribuindo-lhes atividade ACE- inibitória. A enzima conversora de angiotensina (do inglês ACE) exerce papel importante na regulação da pressão sanguínea, pois promove a conversão de angiotensina I (decapeptídeo) para angiotensina II (octapeptídeo), que é um potente vasoconstritor, e inativa a bradicinina, que é um vasodilatador. Por isso, compostos com atividade ACE-inibitória são utilizados para tratamento de hipertensão (MADUREIRA et al., 2010).

O heptapeptídeo ALPMHIR derivado da  $\beta$ -Lg do soro é o mais potente peptídeo com atividade ACE-inibitória. A tripsina tem sido largamente usada para produzir hidrolisados com atividade ACE-inibitória, pois a hidrólise resulta em uma sequência de aminoácidos com resíduos hidrofóbicos (MADUREIRA et al., 2010). Os peptídeos com atividade ACE inibitória são geralmente de cadeia curta, com resíduos polares de aminoácidos, como a prolina (FUGLSANG et al., 2003, apud HARTMANN; MEISEL, 2007). Um número de di, tri ou oligopeptídeos contendo Tyr a partir de várias fontes de proteína exibem atividade ACE- inibitória contribuindo para a regulação da pressão sanguínea (NARAI-KANAYAMA et al., 2010).

Os derivados de lactoferrina (LF), dentre estes a lactoferrina de origem bovina (BLFcin), destaca-se entre os peptídeos de soro de leite com atividade antimicrobiana, tanto para bactérias gram positivas ou gram negativas, assim como fungos (MADUREIRA et al., 2010). O mecanismo antibacteriano das lactoferrinas está associado a alterações na permeabilidade da membrana (HARTMANN; MEISEL, 2007).

Além de ser um ingrediente para receitas médicas, os hidrolisados estão ganhando espaço como alimento para atletas e para dietas de controle de peso. A diminuição da massa muscular esquelética está associada à idade e à inatividade física. A manutenção ou o ganho de massa muscular está diretamente relacionada com a nutrição: pessoas fisicamente ativas e atletas necessitam de maior quantidade proteica do que as estabelecidas para indivíduos sedentários. A rápida absorção dos peptídeos do soro faz com que as concentrações plasmáticas (no interior da célula muscular) de muitos aminoácidos, inclusive a leucina que é um importante desencadeador da síntese proteica, atinjam altos valores logo após a sua ingestão, otimizando a síntese e reduzindo o catabolismo proteico (HARAGUCHI, ABREU, PAULA, 2006).

Durante o metabolismo de proteínas, no primeiro estágio de hidrólise ocorre a formação de oligopeptídeos contendo de 2 a 6 resíduos de aminoácidos livres. Estes peptídeos são, então, quebrados em di-tripeptídeos e absorvidos nesta forma ou como aminoácidos livres (FRENHANI; BURINI, 1999 apud AFONSO, 2008).

Estudos demonstram que hidrolisados proteicos contendo principalmente di e tri-peptídeos são absorvidos mais rapidamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres e proteínas intactas (SAHA; HAYASHI, 2001, AFONSO, 2008). Assim, o consumo destes produtos permite maximizar a liberação de nutrientes para o corpo (BRANDELLI et al., 2015).

A introdução de hidrolisados proteicos ricos em di-tripeptídeos na dieta é importante em situações como má absorção intestinal, intolerância às proteínas do leite, deficiência enzimática, como a fenilcetonúria, por exemplo, suplementação dietética de idosos, recém-nascidos prematuros, nutrição de atletas, entre outros (AFONSO, 2008).

### **2.3.1 Atividade antioxidante de peptídeos**

Um viés de estudo importante trata da obtenção de peptídeos de soro com atividade antioxidante. A ação antioxidante dos peptídeos a partir de hidrolisados dá-se pela inativação de oxigênios reativos, captura de radicais livres, inibição da oxidação lipídica, quelação de íons metálicos ou uma combinação destes mecanismos (BRANDELLI, et al., 2015).

Vários estudos tem demonstrado que o peso molecular, a composição e sequência aminoacídica destes peptídeos tem influência direta na sua ação antioxidante (CHEUNG et al., 2012, CORRÊA et al., 2014, SARMADI; ISMAIL, 2010, PENG; XIONG; KONG, 2009, PHELAN et al., 2009).

Há uma relação entre o potencial antioxidante e o peso molecular, sendo que peptídeos de baixo peso molecular contribuem para uma maior atividade antioxidante (BRANDELLI, et al., 2015). O tamanho, especialmente na faixa de 0,5 – 3 kDa, tem sido sugerido como fator crucial que afeta a atividade antioxidante de peptídeos (CHEUNG et al., 2012).

Não só a composição e sequência aminoacídica, mas a presença de aminoácidos hidrofóbicos entre as sequências é considerada fator chave na determinação da atividade antioxidante de peptídeos (AHMED, et al., 2015, CORRÊA, et al., 2015).

A opção de reduzir o estresse oxidativo no organismo via a administração oral de peptídeos antioxidantes é interessante em vista dos processos inflamatórios causados por espécies de oxigênio reativo nas células vivas (KORHONEN, 2009).

## 2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO SORO

### 2.4.1 Hidrólise de proteínas

A hidrólise proteica pode ser química ou enzimática e é caracterizada pelo rompimento das ligações peptídicas das proteínas. A hidrólise química não é indicada por comprometer o valor nutricional da proteína, ser inespecífica e possibilitar a destruição de aminoácidos essenciais como o triptofano (CHEISON et al., 2007; AFONSO, 2008). A hidrólise enzimática de proteínas é um processo popular para adaptação de diversos produtos geralmente funcionais ou bioativos (CHEISON et al., 2007).

As proteínas do soro de leite podem ser hidrolisadas para modificar suas propriedades funcionais, como: melhorar a solubilidade, quando a hidrólise da caseína aumenta a solubilidade em pH próximo ao ponto isoelétrico e permite o uso em aplicações que requerem elevada solubilidade em baixo pH; aumentar sua resistência à precipitação em meios ácidos; melhorar a estabilidade térmica (SAHA; HAYASHI, 2001; SUJITH; HYMAVATHI, 2011).

As propriedades nutricionais, funcionais e imunológicas das proteínas também podem ser melhoradas a partir da hidrólise. A hidrólise enzimática aumenta o valor nutricional das proteínas por tornar os sítios ativos de clivagem disponíveis à ação de enzimas (TORRES, 2005).

As proteínas do soro contêm várias sequências de aminoácidos com propriedades bioativas. A hidrólise dessas frações pode liberar peptídeos conhecidos como peptídeos biologicamente ativos (BARBOSA, 2013). Muitas das funções biológicas atribuídas às proteínas do soro só se manifestam após a sua proteólise, pois são os peptídeos, encriptados nas sequências proteicas originais, que atuam a nível celular e então exercem funções orgânicas (TORRES, 2005).

O leite bovino constitui base para diversos produtos da alimentação humana, inclusive formulados infantis. No entanto, uma das principais diferenças entre o leite humano e o leite bovino é a presença, neste último, da proteína  $\beta$ -Lg, maior constituinte do soro, que não é produzida no leite humano e pode causar problemas alérgicos quando ingerida devido à falta de enzima para sua digestão. As reações alérgicas se manifestam sob sequências específicas de aminoácidos na proteína de soro nativa. Uma alternativa para diminuir a alergenicidade destes alimentos é a hidrólise de suas proteínas (YADAV et al., 2015; GUADIX et al., 2006).

O uso combinado de enzimas é frequentemente utilizado para obter produtos finais com características específicas, como amargor reduzido, ausência de sequências ou de aminoácidos específicos, como a fenilalanina, para pacientes fenilcetonúricos. Galvão et al. (2009) hidrolisaram o soro de leite com uma combinação de três enzimas para remoção da fenilalanina do hidrolisado: a tripsina, uma endoprotease que promove o desdobramento das proteínas e a exposição de resíduos hidrofóbicos e aromáticos; a quimotripsina, também uma endoprotease, com afinidade para aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos, inclusive a fenilalanina, no lado carboxílico; e por fim a carboxipeptidase A, uma exoprotease com seletividade para aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos na posição carbono-terminal. Assim, em uma sequência de hidrólise controlada, a tripsina facilita a ação da quimotripsina expondo seções hidrofóbicas e esta por sua vez pode proporcionar a quantidade máxima de peptídeos com resíduos de fenilalanina no lado carboxílico para a ação da carboxipeptidase A. Os resultados mostraram que a quimotripsina foi suficiente e apresentou melhor resultado quanto a liberação de maior quantidade de fenilalanina e menor concentração de peptídeos menores do que 1 kDa.

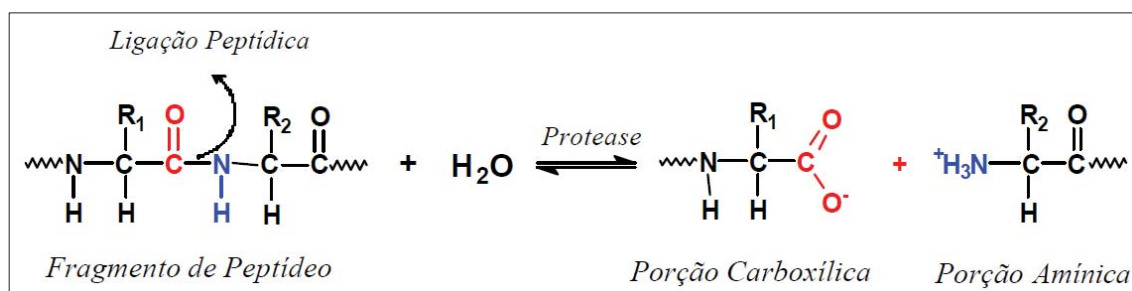
#### **2.4.2 Mecanismo de hidrólise**

As enzimas possuem três principais características que as diferem entre si e devem ser elucidadas: estabilidade, atividade e especificidade (GALVÃO, 2004; PINTO, 2008). A estabilidade de uma enzima está relacionada a sua capacidade de manter sua estrutura nativa, preservando o sítio ativo e assim sua capacidade catalítica, frente a variações na temperatura, pH, força iônica e presença de solventes apolares. A especificidade da enzima define a afinidade de uma enzima por grupos específicos em um determinado substrato. A atividade da enzima está relacionada com a diminuição da energia de ativação requerida para transformar um substrato, aumentando a velocidade de reações específicas (GALVÃO, 2004).

O perfeito funcionamento das enzimas requer certas condições específicas, pois estas moléculas demonstram sua mais expressiva atividade em faixas bastante estreitas de pH e temperatura (GALVÃO, 2004).

As proteases são enzimas específicas que catalisam reações de hidrólise de ligações peptídicas de proteínas. Na proteólise de uma ligação peptídica, uma molécula de água reage com um grupo carboxil e a ligação com o grupo amino do aminoácido seguinte é rompida (GALVÃO, 2004). O mecanismo de hidrólise por proteases é mostrado na Figura 1.

Figura 1. Mecanismo de hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por protease.



Fonte: GALVÃO (2004).

### 2.4.3 Grau de hidrólise

A hidrólise enzimática apresenta vantagens frente à hidrólise química para obtenção de hidrolisados de proteínas com elevada qualidade nutricional, como a seletividade, possibilidade de operação em temperaturas moderadas, não há adição de substâncias no meio reacional e, por fim, permite a conservação do valor nutritivo e funções biológicas (GALVÃO, 2004; BARBOSA, 2013).

No entanto, a hidrólise excessiva produz alto conteúdo de aminoácidos livres resultando em produtos de alta osmolalidade (GUADIX et al., 2006). Além disso, o tratamento enzimático das proteínas pode resultar em sabor amargo devido a formação de peptídeos de baixo peso molecular com resíduos hidrofóbicos de aminoácidos, sendo este o principal aspecto indesejável (SUJITH; HYMAVATHI, 2011). Em muitos casos aplicam-se processos posteriores à hidrólise para a remoção do amargor dos hidrolisados (SAHA E HAYASHI, 2001).

Estudos mostram que a extensão na qual as propriedades funcionais, bioativas e sensoriais, além do grau de alergenicidade de uma proteína, podem ser alteradas por hidrólise é muito dependente do grau de hidrólise ao qual as proteínas foram submetidas (GALVÃO, 2004; CHEISON et al., 2009).

Para prevenir este efeito é necessário ter uma medida da extensão da degradação hidrolítica, ou seja, do grau de hidrólise (GH). Define-se grau de hidrólise como a porcentagem do número total de ligações peptídicas em uma proteína que foi rompida durante o processo de hidrólise.

De acordo com o grau de hidrólise alcançado no processo, diferentes peptídeos são formados com variações nas massas molares e na sua funcionalidade. De acordo com Parkin et al. (2010), para GH entre 3 e 6%, peptídeos de tamanho médio de 2 a 5 kDa são formados, e são desejáveis para a funcionalidade física do hidrolisado. Para GH próximo de 8% forma-se

peptídeos de tamanho médio entre 1 a 2 kDa, com ótima solubilidade e indicado para uso em nutrição clínica e esportiva. Um GH entre 50 a 70% gera pequenos peptídeos e aminoácidos, menores que 1 kDa em média, utilizados na formulação de alimentos infantis hipoalergênicos e como ingredientes saborizantes para sopas e molhos. Em GH superior a 70% observa-se acúmulo de peptídeos amargos devido ao tamanho reduzido e a hidrofobicidade. Durante processos de hidrólise o grau de hidrólise deve ser monitorado de acordo com a faixa de pesos moleculares pretendida e também para evitar perdas sensoriais.

Diversos métodos podem ser usados para quantificar o GH, como: pH-stat, descrito por Adler-Nissen (1986), método de titulação de grupos  $\alpha$ -amino liberados em pH e temperatura constantes durante a hidrólise, titulando-se com formol, ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), entre outros (CHEISON et al., 2009).

#### **2.4.4 Amargor de peptídeos**

Algumas proteases têm especificidades mais amplas. Um exemplo é a Subtilisina A, grupo do qual a Alcalase 2.4L faz parte, uma serina endoprotease que hidrolisa as ligações de peptídeos quando a cadeia lateral R1 (Figura 1) (fração carboxílica) é um resíduo de aminoácido hidrofóbico. Desta maneira, a ação da enzima expõe os aminoácidos hidrofóbicos, antes protegidos no interior da molécula de proteína intacta, e à medida que a hidrólise continua mais resíduos são expostos e, por conseguinte, o amargor do hidrolisado aumenta, já que a hidrofobicidade tem relação com a percepção amarga pelas papilas gustativas (SUJITH; HYMAVATHI, 2011, SPELLMAN; O'CUINN; FITZGERALD, 2009).

Tem sido proposto que o grau de hidrofobicidade é o mais importante precursor da amargura de peptídeos (SUJITH; HYMAVATHI, 2011, Cheung et al., 2015). Mais especificamente, peptídeos menores do que 6 kDa contendo um alto teor de resíduos de Leu, Pro, Phe, Tyr, Ile e Trp são susceptíveis a serem amargos (SUJITH; HYMAVATHI, 2011). Similarmente, através de modelagem computacional, o amargor de peptídeos tem sido correlacionado a presença de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos particularmente na posição C-terminal, e pesos moleculares menores do que 1000 Da. (Kim & Li-Chan, 2006).

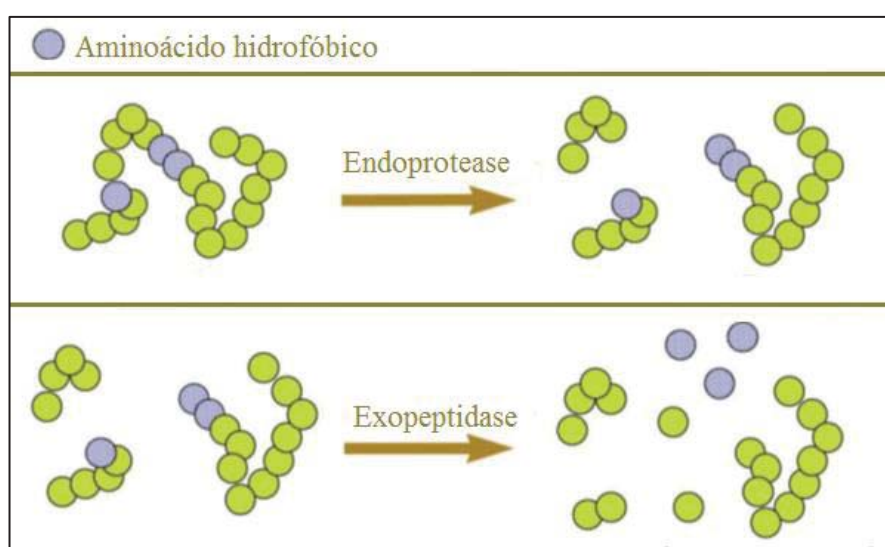
A tendência ao amargor é reduzida quando o substrato é subsequentemente hidrolisado com exoproteases (NOVOZYMES, CHEUNG et al., 2015, RAKSAKULTHAI; HAARD, 2003). O tratamento com exopeptidase também aumenta o sabor salgado e umami, e melhora no geral a aceitabilidade dos hidrolisados, sendo que estas alterações são devido a liberação de certos aminoácidos terminais e pequenos peptídeos que agem como componentes de sabor

agradável ou precursores de sabor (CHEUNG et al., 2015, RAKSAKULTHAI; HAARD, 2003).

A Flavourzyme® é uma exopeptidase, cuja enzima declarada é aminopeptidase, que libera aminoácidos por hidrólise da ligação peptídica N-terminal. Dada a especificidade da enzima, ela cliva um aminoácido por vez, o que leva a formação de aminoácidos livres e pequenos peptídeos (NOVOZYMES).

Um esquema que elucida a ação endo e exoproteolíticas das enzimas é apresentado na Figura 2.

Figura 2. Mecanismos de ação de enzimas endo e exoproteolíticas.



Fonte: Novozymes.

Contudo, o amargor também tem sido relacionado a atividades biológicas dos peptídeos, como atividade ACE-inibitória e atividade antioxidante, já que ambos os atributos têm sido associados com peptídeos de baixo peso molecular contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (CHEISON; WANG; XU, 2007, CHEUNG et al., 2015).

Desta maneira, embora seja um eficiente método para remover o amargor dos peptídeos, o tratamento com exopeptidase pode provocar a clivagem de resíduos de aminoácidos pertinentes a bioatividade do peptídeo.

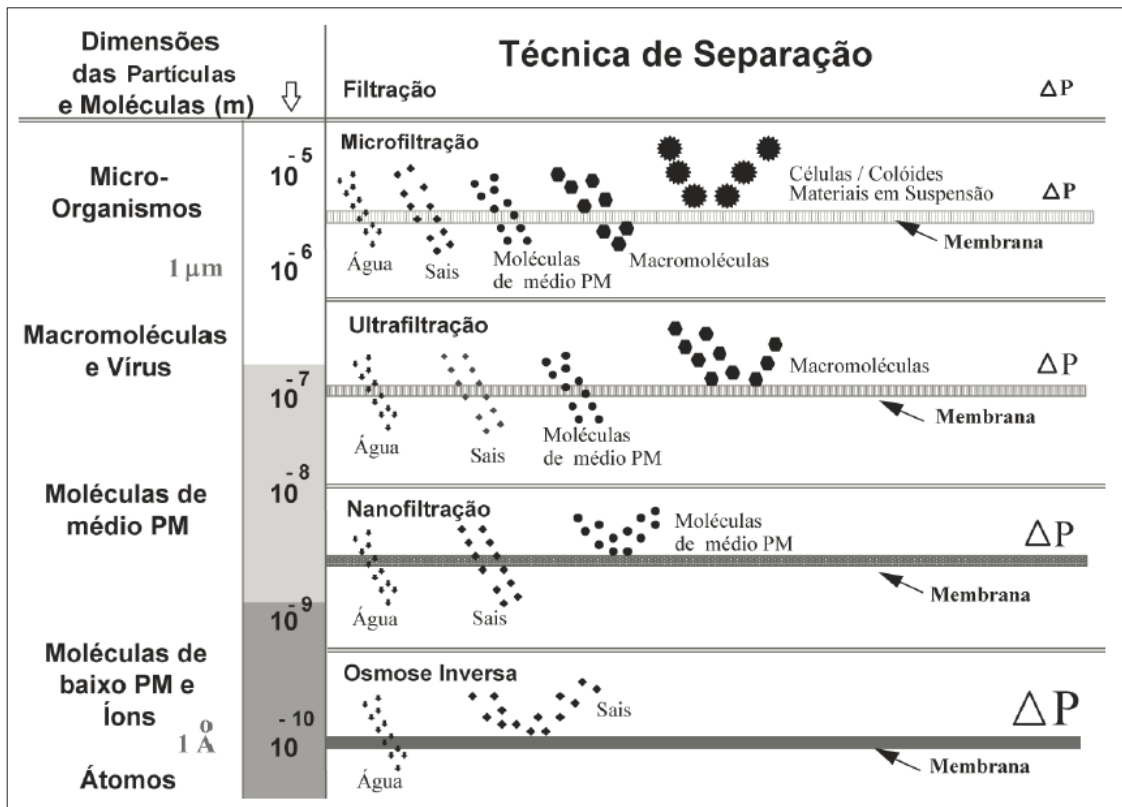
## 2.5 ULTRAFILTRAÇÃO DOS HIDROLISADOS PROTEICOS

Os Processos de Separação por Membranas (PSMs) são utilizados visando-se a separação, concentração e/ou a purificação de componentes presentes em solução, pois a membrana atua como uma barreira seletiva que separa duas fases, alimentação e permeado, restringindo o transporte de uma ou mais espécies presentes nestas fases (BALDASSO, 2011). Neste tipo de processo, a separação é baseada, essencialmente, no tamanho molecular dos compostos (TORRES, 2005).

Em função da natureza e do tipo de solutos, e da presença ou não de partículas em suspensão, membranas com diferentes tamanhos de poros são empregadas, caracterizando os processos conhecidos como Microfiltração (MF), Ultrafiltração (UF) e Osmose Inversa (OI) (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

Membranas mais fechadas oferecem uma maior resistência à transferência de massa, e por isso uma força motriz maior, ou seja, maior pressão de operação, é necessária para obter fluxos permeados economicamente viáveis. Na Figura 3 são apresentadas as principais características dos PSMs que utilizam a diferença de pressão como força motriz (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

Figura 3. Características de processos que utilizam diferença de pressão como força motriz.



Fonte: HABERT; BORGES; NÓBREGA (2006).



As membranas de UF apresentam poros entre 1 e 100 nm, assim, soluções contendo solutos numa faixa de massa molar entre  $10^3 - 10^6$  Dalton podem ser tratadas por este processo. Como os poros das membranas de UF são menores comparados aos da MF, uma força motriz ainda maior é necessária (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

A força motriz utilizada, bem como a morfologia da membrana, determina o mecanismo de transporte através dessa, que pode ser convectivo e/ou difusivo. No caso de membranas de MF e UF, a contribuição difusiva ao fluxo do soluto é desprezível, e o fluxo é essencialmente convectivo, uma vez que essas membranas utilizam como força motriz o gradiente de pressão (BALDASSO, 2011; TORRES, 2005; HABERT; BORGES; NÓBREGA; 2006).

### **2.5.1 Fluxo e permeabilidade**

Em processos que utilizam pressão como força motriz, o fluxo permeado de solvente puro é diretamente proporcional ao gradiente de pressão. Dessa forma, admitindo que a membrana seja inerte em relação ao solvente e não apresente deformação pela ação da pressão (compactação), o fluxo de permeado apresentará uma dependência linear com a pressão. Para uma mesma pressão de operação, observa-se que o fluxo de permeado diminui com o aumento da viscosidade do fluido, ou seja, a permeabilidade da membrana é inversamente proporcional à viscosidade do meio fluido (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006). A viscosidade é amplamente influenciada pela temperatura, um aumento na temperatura provoca diminuição na viscosidade de uma solução, o que contribui para aumento de fluxo e permeabilidade.

Os fluxos de permeado em UF situam-se na faixa de 150 a 250 L/h.m<sup>2</sup>, porém, fluxos bem menores podem ser obtidos em função da polarização por concentração e da incrustação, em função da natureza do soluto e sua interação com os componentes da membrana, das condições de operação do sistema e da estabilidade mecânica da membrana (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

As principais causas de redução dos fluxos de permeado estão associadas a polarização por concentração, que causa um rápido declínio, e a incrustação, que causa declínio gradual e lento no fluxo. A incrustação se deve ao acúmulo de partículas e/ou a cristalização/precipitação de pequenas moléculas na superfície e nos poros da membrana, e sua extensão depende das características da solução a ser filtrada assim como da interação desta com a membrana. As condições de operação, tais como a pressão transmembrana e a velocidade de escoamento, também exercem efeito direto nos fenômenos de polarização e incrustação. Maiores velocidades de escoamento induzem a turbulência na superfície da membrana, reduzindo a

possibilidade de formação de zonas de concentração, e assim, a polarização por concentração. A pressão transmembrana aumenta linearmente com a pressão até um dado limite, que depende das propriedades do sistema. Em baixas pressões, o fluxo é governado essencialmente pela Lei de Darcy, enquanto que para altas pressões o fluxo se torna independente da pressão devido a polarização por concentração e formação de gel e/ou torta na superfície da membrana, tornando-se uma resistência adicional ao escoamento. Geralmente, a pressão transmembrana escolhida é aquela na qual a relação fique mais próxima da linearidade (BRIAO; TAVARES, 2012; GIRARD; FUKUMOTO, 2000).

As resistências presentes nos processos de separação por membranas podem ser sumarizadas em três resistências principais:  $R_m$  é a resistência hidráulica oferecida pela membrana limpa e a resistência adicional é formada pela soma da resistência a incrustação,  $R_i$ , formada pela deposição irreversível na superfície da membrana, como adsorção; e pela resistência devido ao fenômeno reversível de polarização por concentração,  $R_p$  (Gésan-Guisiou, 1999).

### **2.5.2 A UF aplicada à separação de hidrolisados de soro**

Os PSMs têm sido especialmente úteis na produção de hidrolisados. Não há necessidade de tratamento térmico, podendo ser aplicados no fracionamento de substâncias termolábeis, como as proteínas do soro, de modo que as propriedades nutricionais e os componentes bioativos tendem a permanecer intactos durante o processo de filtração. Além disso, é facilmente escalável e mais barato comparado às técnicas cromatográficas de fracionamento (TAVARES et al, 2012).

Ao passo que a tecnologia de membranas apresenta aspectos favoráveis a produção de hidrolisados, também há aspectos negativos associadas ao decaimento do fluxo de permeado. Dentre os fatores que causam a redução do fluxo permeado citam-se, principalmente, a incrustação, a polarização por concentração e formação de camada gel.

Em processos de filtração de soro de leite a incrustação na superfície da membrana é a principal dificuldade encontrada, pois causa a diminuição do fluxo de permeado limitando a concentração e a eficiência de fracionamento (STEINHAUER, et al., 2015-a). Este fenômeno pode acontecer quando o tamanho dos poros da membrana é muito próximo ao diâmetro do soluto, causando a obstrução dos poros ou a interação química ou física com este.

Nos últimos anos diversos autores têm estudado isoladamente a influência de cada componente no fenômeno da incrustação. Estudos acerca da SAB mostraram que os agregados

da proteína são formados por cisalhamento durante a filtração de fluxo cruzado, e depositam-se na superfície da membrana, ao passo que a  $\beta$ -Lg não é sensível ao cisalhamento do fluxo. Neste mesmo estudo, provou-se que os agregados de SAB agem como catalisadores da incrustação quando depositados na membrana e que este comportamento está baseado na exposição e reações dos grupos tiol (STEINHAUER et al., 2015-a; KELLY; ZYDNEY, 1997, apud STEINHAUER et al., 2015-a).

A  $\beta$ -Lg contém um grupo sulfidril livre, e, portanto, os fenômenos de incrustação da membrana por reações do grupo tiol também é aplicável neste caso. As reações entre o grupo tiol e dissulfeto formam os agregados de  $\beta$ -Lg durante o processamento térmico, cuja formação da rede de gel que causa a incrustação na membrana é facilitada pela presença de cálcio (STEINHAUER, et al., 2015-a).

A polarização por concentração se dá com o aumento localizado da concentração de sólidos rejeitados na superfície da membrana, devido a seu transporte convectivo. Este fenômeno pode ser minimizado aumentando-se a velocidade de escoamento na superfície da membrana, pois quanto maior a velocidade, menor tende a ser a intensidade da polarização por concentração. Assim, a polarização por concentração depende das condições hidrodinâmicas do escoamento da solução a ser filtrada (SERPA, 2012; BASSETTI, 2002).

A formação de uma camada gel ocorre quando o aumento da concentração de sólidos na superfície da membrana excede seu limite de solubilidade (BASSETTI, 2002). A formação desta camada cria uma resistência adicional ao fluxo.

Dentre outros fatores, a velocidade tangencial, pressão, temperatura, tamanho das partículas e características da membrana afetam diretamente o seu desempenho em processos de separação (SERPA, 2012).

Galvão et al. (2009) utilizaram três diferentes enzimas imobilizadas para hidrólise em batelada sequencial do soro de leite e submeteram o hidrolisado final a ultrafiltração com membrana para remoção de fenilalanina.

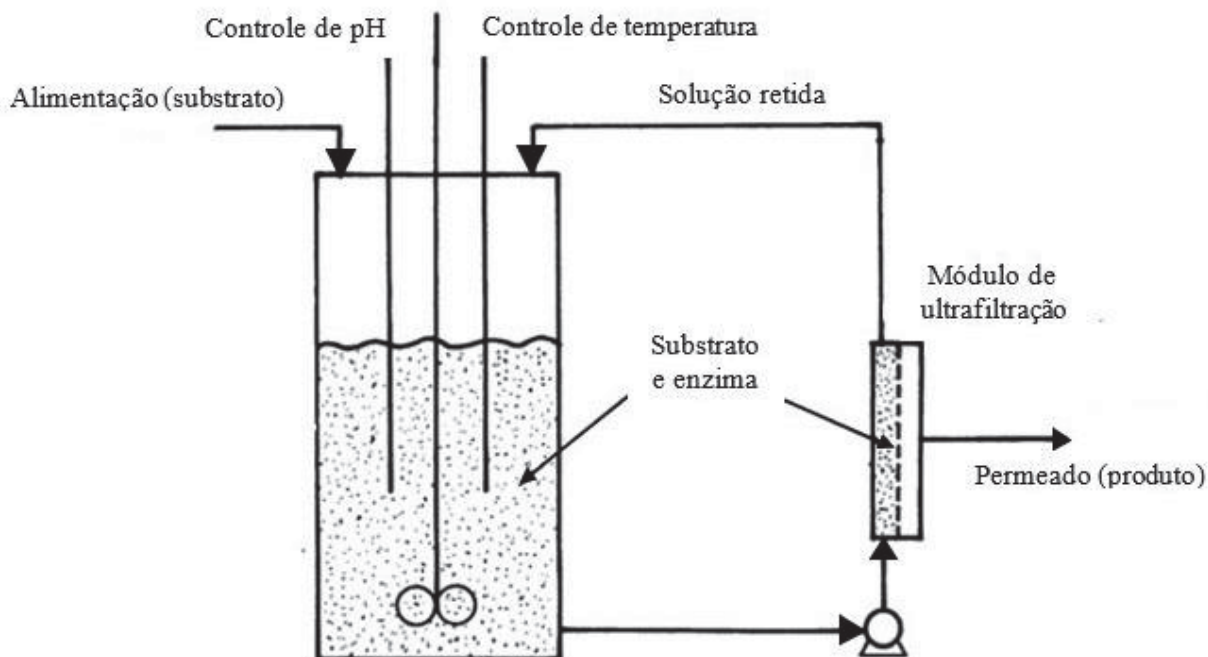
## 2.6 REATOR ENZIMÁTICO DE MEMBRANA

Processos em batelada para hidrólise de proteínas são comumente empregados para obtenção de peptídeos. No entanto, é um processo demorado e o acúmulo de peptídeos no meio age como um inibir competitivo da hidrólise, e com isso é necessário maior tempo de processo, o que pode progressivamente causar a inativação das enzimas (PEREA; UGALDE, 1996), as

quais devem ser frequentemente adicionadas. O tempo de processo e a grande quantidade de enzima requerida reduzem a viabilidade econômica do processo.

O conceito de um reator de membrana com reciclo (MRR – *Membrane Recycle Reactor*) operado continuamente, conforme esquema apresentado na Figura 4, foi primeiramente demonstrado em 1972 (SCHWARTZBERG; RAO, 1990).

Figura 4. Configuração do CSTMRBR



Neste conceito, a solução contendo enzima confinada em um reator contínuo de tanque agitado (CSTR – *Continuous-Stirred Tank Reactor*) é continuamente circulada através de um módulo de ultrafiltração, onde o ultrafiltrado livre de enzima é continuamente removido enquanto novo substrato para a conversão enzimática é continuamente alimentado ao reator. Esta configuração resulta em geração e isolamento contínuo de produto, sem perda da enzima (SCHWARTZBERG; RAO, 1990). Usualmente, o termo biorreator é utilizado para indicar reações enzimáticas. Assim, esta configuração é denominada CSTMRB (*Continuous-Stirred Tank Membrane Recycle Biorreactor*) – biorreator contínuo de tanque agitado acoplado a membrana com reciclo. Ao longo do texto, para abreviação, será utilizado o termo reator enzimático de membrana, ou REM, como referência ao sistema.

O uso de processos combinados, reação e separação, operando em modo contínuo, apresentam vantagens especialmente quando a reação é enzimática, como: a remoção dos peptídeos do meio reacional evitando o problema de inibição e atingindo altos valores de

conversão; a massa molecular dos produtos é controlada pelo tamanho dos poros da membrana; o reciclo da enzima ao tanque de reação possibilita menor custo de operação, assim como a dispensa da temperatura para inativação, que certamente teria um alto custo energético. Processos com operação contínua apresentam melhor rendimento global. (CHEISON et al., 2006; PRIETO et al., 2007).

No biorreator a enzima solúvel fica no retentado da membrana, onde permanece em contato com o substrato enquanto os produtos com tamanho ao menos igual o peso de corte permeiam através da membrana (GUADIX, CAMACHO, GUADIX, 2006).

Os PSMs apresentam uma série de vantagens inerentes a esta tecnologia: economia de energia – pois promovem a separação sem que ocorra a mudança de fase –, seletividade, separação de compostos termolábeis, simplicidade de operação e escalonamento (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE

Foi utilizado CPS obtido através de processo desenvolvido pelo grupo de pesquisa ligado a este projeto, no Laboratório de Operações Unitárias da UPF. A Tabela 3 apresenta a caracterização do CPS seco pelo processo de *spray dryer* (Labmaq 1.0), o qual foi apropriadamente diluído para uso nos experimentos realizados neste trabalho.

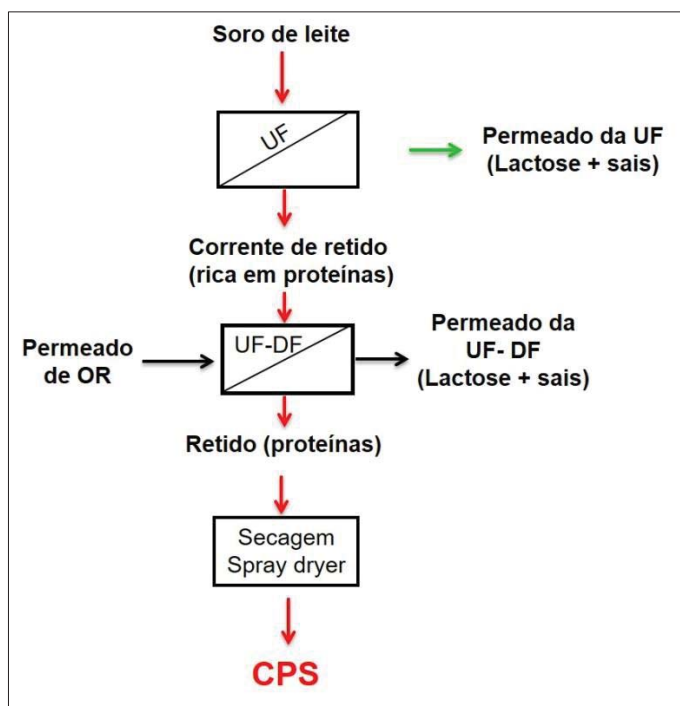
Tabela 3. Composição do concentrado proteico de soro de leite em pó obtido por processo de *spray dryer*.

Parâmetros	Concentração no CPS
Proteína (g/100g)	82,0±8,93
Lactose (g/100g)	ND
Gordura (g/100g)	6,13±0,65
Cinzas (g/100g)	3,46±2,42
Nitrogênio livre (g/100g)	0,13±9,42
Sólidos totais (g/100g)	94,02±0,89
Umidade (g/100g)	5,97±0,89
Na (mg/kg)	1902±154
K (mg/kg)	2592±509
Mg (mg/kg)	595±442
Ca (mg/kg)	3870±968
P (mg/kg)	586±402

\* ND: não detectado  
Fonte: Seguenka (2015).

A Figura 5 mostra o processo de obtenção do CPS em pó.

Figura 5. Fluxograma do processo de obtenção do concentrado proteico de soro de leite desenvolvido no Laboratório de Operações Unitárias da UPF utilizado como matéria-prima para a hidrólise.



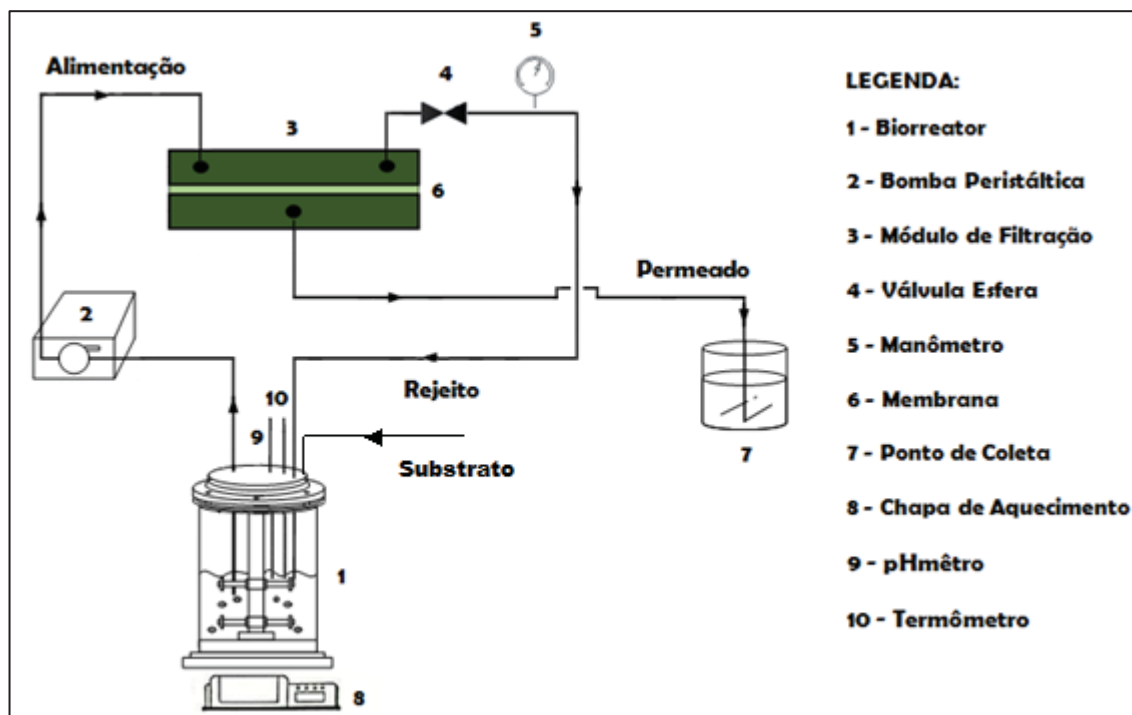
Fonte: SEGUENKA (2015).

Legenda: UF: ultrafiltração; DF: diafiltração; OR: Osmose reversa

### 3.2 OPERAÇÃO DO REATOR ENZIMÁTICO DE MEMBRANA

Os ensaios foram conduzidos em estrutura montada de maneira a configurar um reator enzimático de membrana com fluxo contínuo, conforme mostrado na Figura 6, que opera da seguinte maneira: o substrato com a enzima é mantido na temperatura e pH de referência, com agitação constante. A solução é bombeada através da bomba peristáltica até o módulo de membrana, cujo fluxo se dá na forma tangencial. Uma válvula na corrente de rejeito controla a pressão transmembrana, e o rejeito retorna para o biorreator, cujo volume é mantido constante com adição de substrato na mesma proporção de coleta de permeado.

Figura 6. Esquema de operação do Reator Enzimático de Membrana em fluxo contínuo com reciclo da solução proteica não permeada.



Fonte: RODEGHERI et al., 2015.

Para hidrólise das proteínas foi utilizada a enzima Alcalase® 2.4 L FG, uma serino endopeptidase de origem microbiana produzida a partir de *Bacillus licheniformis*, fabricada pelo laboratório Novozymes. Esta enzima possui 274 aminoácidos e massa molecular de 27436 kDa. De acordo com as recomendações do fabricante, as condições ideais para uso dessa enzima são: concentração de 8 a 12% da fonte proteica e 0,5 a 2% de enzima em relação ao teor de proteína da matéria-prima. No entanto, em função do uso de membrana, optou-se por utilizar menor concentração proteica como estratégia para evitar entupimento excessivo. Assim, utilizou-se solução proteica com 5% de proteína, relação enzima:substrato de 0,02, temperatura de 55 °C e pH de 8,5, ótimos para a enzima.

A membrana utilizada foi uma membrana plana de ultrafiltração fabricada pela Osmonics G.E, modelo YMPTSP3001 cujo material de confecção é polietersulfona, com área efetiva de ultrafiltração de  $2,856 \times 10^{-3} \text{ m}^2$  e massa molecular de corte de 5000 Da, o qual foi selecionado por diferir largamente do tamanho da enzima, pelo fato de a alergenicidade ser reduzida em peptídeos com massa molecular abaixo deste valor e por estes peptídeos apresentarem melhores índices de absorção.

Antes do uso a membrana permaneceu 48 horas em solução de álcool 70% e 24 horas imersa em água destilada, posteriormente foi enxaguada com recirculação de água, na mesma



configuração usada para os experimentos, a fim de atingir sua real porosidade. Após cada experimento com a solução proteica a membrana passou por procedimentos de limpeza que estão descritos no Apêndice A.

### 3.2.1 Caracterização inicial da membrana

Para operações com membranas, avaliações preliminares devem ser conduzidas com água para determinar as condições iniciais como permeabilidade, resistência e fluxo de permeado em função da pressão e temperatura empregadas. Este procedimento inicial permite conhecer o comportamento das membranas para as condições a serem empregadas no processo, evitando interferências de compostos que possam causar incrustação ou interações. O objetivo principal é criar uma referência de fluxo ideal para conduzir o procedimento de limpeza após os ensaios com a solução hidrolisada até que se reestabeleça o fluxo inicial.

O tanque de reação foi alimentado com 1 L de água destilada e foi acionada a bomba, com reciclo total para o tanque. O permeado foi coletado em triplicata e o fluxo foi calculado através da Equação 1. Tais medidas foram conduzidas com água em temperatura ambiente, 25 °C, para fins de comparação de fluxo ideal no momento da limpeza, e a 55 °C, simulando a mesma condição que será usada no ensaio com hidrólise.

O mesmo procedimento foi feito com a solução proteica a 50 g.L<sup>-1</sup> sem adição de enzima, com temperatura de 55 °C e pH ajustado para 8,5, com o objetivo de verificar a estabilidade do sistema dentro do intervalo de pressão testado, que variou de 0,25 a 2,5 bar.

O fluxo de permeado ( $F_p$ ) é obtido através da Equação 1.

$$F_p = \frac{V}{t.A} \quad (1)$$

sendo:

V: volume de permeado coletado num determinado tempo;

t: tempo de obtenção do permeado durante o qual a amostra foi coletada;

A: área de filtração da membrana.

### 3.2.2 Hidrólise e ultrafiltração do hidrolisado de soro

O tanque de reação foi alimentado com 0,5 L de solução de CPS contendo 50 g.L<sup>-1</sup> de proteína, mantido a temperatura de 55 °C e pH ajustado para 8,5 com adição de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>. Após a padronização da solução a enzima pré-dissolvida foi adicionada e deu-se início a filtração. O pH foi mantido constante através da adição de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>, já que a liberação de prótons durante a hidrólise causa a sua diminuição.

A pressão transmembrana foi ajustada para 1 bar, e o volume da corrente de rejeito contendo proteínas parcialmente hidrolisadas e a enzima foi continuamente reciclado para o reator, cujo volume foi mantido constante através da alimentação contínua de substrato.

O sistema foi mantido em operação até que o fluxo de permeado atingisse o estado estacionário, ou até que o conteúdo de nitrogênio no permeado se mantivesse constante por períodos superiores a 90 min, conforme adotado por Perea e Ugalde (1996), indicando estado estacionário do sistema.

### 3.2.3 Análise de resistências

A dependência do fluxo em relação a pressão é dada pela Equação 2, de acordo com a Lei de Darcy (GÉSAN-GUISIOU, 1999):

$$F_p = \frac{\Delta P}{\mu \cdot R_t} \quad (2)$$

sendo:

$F_p$ : é o fluxo do permeado;

$\Delta P$ : é a pressão transmembrana;

$R_t$ : é a resistência total imposta ao fluxo;

$\mu$ : é a viscosidade dinâmica do fluido.

Modelos de resistência em série tem sido usados para avaliar os processos de separação por membranas (BRIÃO, TAVARES, 2012). Para o caso de filtração de produtos de soro, a Equação 2 pode ser reescrita da seguinte forma, como mostra a Equação 3 (GÉSAN-GUISIOU, 1999):

$$F_p = \frac{\Delta P}{\mu(R_m + R_p + R_i)} \quad (3)$$

sendo:

$R_m$ : é a resistência imposta pela membrana;

$R_p$ : é a resistência devido a polarização por concentração;

$R_i$ : é a resistência devido a incrustação; e assim,  $R_t = R_m + R_p + R_i$

A constante de proporcionalidade entre o fluxo e a pressão mostrada na Equação 2, é chamada de permeabilidade hidráulica ( $L_p$ ). Para o caso de o fluido ser exclusivamente água a única resistência é a oferecida pela membrana,  $R_m$ , conforme mostra a Equação 4 (HABERT, BORGES, NÓBREGA, 2006).

$$L_p = \frac{1}{\mu \cdot R_m} \quad (4)$$

A analogia das Equações 2 e 4 permite obter o valor da resistência da membrana ( $R_m$ ) a partir da permeabilidade hidráulica, como mostra a Equação 5:

$$F_p = L_p * \Delta P \quad (5)$$

Assim,  $R_m$  pode ser calculado como o inverso da inclinação da reta ajustada para a permeabilidade da membrana limpa.

A partir dos experimentos com a solução proteica, obtém-se a resistência total média (Equação 6) com o rearranjo da Equação 3:

$$(R_m + R_p + R_i) = \frac{\Delta P}{\mu * F_p} \quad (6)$$

Após o enxágue da membrana depois do processo de filtração do hidrolisado, a resistência formada pela polarização por concentração é removida ( $R_p = 0$ ), e o fluxo medido com água permite o cálculo da resistência devido a incrustação, conforme mostra a Equação 7:

$$R_i = \frac{\Delta P}{\mu * F_p} - R_m \quad (7)$$

$R_i$  pode ser calculado como a diferença entre o inverso da inclinação da reta ajustada para a permeabilidade da membrana após enxágue e  $R_m$ .

Conhecida a resistência total (Equação 2) é possível calcular  $R_p$  por diferença, conforme Equação 8:

$$R_p = R_t - R_i - R_m \quad (8)$$

### 3.2.4 Tratamento da solução proteica retida no REM com exoprotease

Ao final do processo a solução proteica contida no reator foi submetida a hidrólise em reator batelada equipado com membrana, utilizando a enzima Flavourzyme 1000L®, uma aminoexoprotease fabricada pelo laboratório Novozymes, nas condições ótimas para a enzima conforme recomendado pelo fabricante: pH 6,0, temperatura 50°C e relação enzima:substrato de 0,01. O pH do meio foi corrigido com NaOH 1N. Amostras foram coletadas no decorrer do processo para avaliações como massa molecular, atividade antioxidante e amargor dos peptídeos.

## 3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 3.3.1 Teor de proteína e nitrogênio

A caracterização quanto ao teor de proteína e nitrogênio na alimentação e permeado durante a reação fornece dados para avaliação da hidrólise e da atividade enzimática. O teor proteico das amostras foi determinado através do método Kjeldahl (AOAC, 1995), utilizando-se 6,38 como fator de conversão, indicado para lácteos. O conteúdo de nitrogênio não proteico foi medido como nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 8 % (m/v), utilizando os procedimentos para a determinação de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl.

### 3.3.2 Grau de hidrólise

A avaliação do grau de hidrólise foi feita através do método do pH-stat, cuja técnica vale-se do fato de que quando a hidrólise ocorre em pH neutro ou alcalino, a dissociação dos prótons de grupos amino livres é favorecida. A liberação de prótons conduz à diminuição do

pH do meio. Assim, o número de ligações peptídicas clivadas pode ser estimado pela quantidade de base requerida para manter o pH controlado durante a reação (ADLER-NISSEN, 1986). A Equação 9 sugerida por Guadix et al. (2006) é análoga àquela proposta por Adler-Nissen (1986) para hidrólise em batelada, porém, com modificações para o caso de hidrólise contínua: primeiro, os mols de base removidos no permeado são deduzidos dos mols consumidos para manter o pH constante. Segundo, a carga inicial de proteína e a carga cumulativa de proteína alimentada ao reator são consideradas no cálculo do número total de ligações peptídicas envolvidas na reação.

Assim o GH pode ser obtido de acordo com a Equação 9 (GUADIX et al., 2006):

$$\%GH = \frac{\left( M_B - V_P \left( \frac{K_W}{10^{-pH}} \right) \right) \frac{1}{\alpha}}{(V_R + V_P) S_F h_T} * 100\% \quad (9)$$

sendo:

$GH$ : grau de hidrólise (%);

$M_B$ : mols de base consumidos para manter o pH constante (mol);

$V_P$ : volume de permeado acumulado (L);

$V_R$ : volume do reator (L);

$K_W$ : produto iônico da água a 50°C:  $5,8 \times 10^{-14}$ ;

$\alpha$ : grau de dissociação médio dos grupos  $\alpha$ -NH: 0,935;

$S_F$ : concentração proteica inicial do substrato ( $\text{g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ );

$h_T$ : número total de ligações peptídicas em  $\text{mol} \cdot \text{g}_{\text{proteína}}^{-1}$ : 0,0088 para proteínas do soro (ADLER-NISSEN, 1986).

Para o cálculo do GH, o conteúdo de base consumida é registrado em função do tempo, inicialmente fixado em intervalos de 15 minutos e aumentando gradativamente para intervalos de 30 minutos até que as variações do consumo da base sejam insignificantes.

### 3.3.3 Conversão no REM

Os níveis de conversão do substrato ( $X$ ) foram avaliados de acordo com Perea e Ugalde (1996), como sendo a razão entre a concentração de nitrogênio no permeado e a concentração de nitrogênio na corrente de alimentação, deduzindo-se a concentração de nitrogênio não

proteico, conforme a Equação 10. Para tanto, assume-se que a rejeição para o nitrogênio não proteico é zero.

$$X = \frac{N_p - NNP_a}{N_a - NNP_a} \quad (10)$$

sendo:

$N_p$ : concentração de nitrogênio proteico no permeado;

$NNP_a$ : concentração de nitrogênio não proteico na alimentação;

$N_a$ : concentração de nitrogênio na alimentação.

### 3.3.4 Recuperação proteica no REM

A recuperação de proteína (RP) para o REM foi calculada conforme Equação 11:

$$RP = \frac{N_p * (V_p)}{N_a * (V_R + V_p)} \quad (11)$$

sendo:

$N_p$ : concentração de nitrogênio proteico no permeado;

$N_a$ : concentração de nitrogênio na alimentação.

$V_p$ : volume de permeado acumulado (L);

$V_R$ : volume do reator (L).

Considerando que o volume alimentado ao reator é o mesmo volume de permeado acumulado ( $V_p$ ).

A recuperação proteica total é determinada como a soma do percentual proteico recuperado no REM com o percentual recuperado na hidrólise sequencial em reator batelada, em relação ao teor de proteína alimentada ao sistema.

### 3.3.5 Caracterização dos peptídeos

#### 3.3.5.1 Comprimento médio da cadeia e da massa molecular média dos peptídeos

O comprimento médio da cadeia (CMC) e a massa molecular média (MMM) dos hidrolisados foram determinados através das Equações 12 e 13, respectivamente, assumindo-se que um resíduo de aminoácido possua massa média de 120 Da, conforme descrito por Perea et al. (1993).

$$CMC = \frac{100}{GH} \quad (12)$$

$$MMM = CMC * 120 \quad (13)$$

### 3.3.5.2 Eletroforese em gel

O perfil peptídico é caracterizado em função do tamanho da cadeia dos peptídeos obtidos, relacionado ao seu peso molecular, utilizando a técnica de eletroforese em gel. Os perfis eletroforéticos dos peptídeos foram determinados através de sistema Tris-Tricina-SDS-PAGE, conforme descrito por Jiang et al. (2016), utilizando-se o sistema de eletroforese Mini-Protean II Cell da Bio-Rad com placas de vidro de 6 x 8 cm e espessura de 1,0 mm.

Para polimerização do gel de corrida foram utilizadas soluções de dois monômeros (acrilamida/bis) em duas diferentes concentrações: a) 5 % e 3 % no gel de aplicação da amostra b) 18 % e 6 % para o gel de separação. As amostras foram preparadas para aplicação solubilizando-se 100 µL do hidrolisado em 200 µL de tampão (4 % SDS, 12 % glicerol, 50 mM de Tris, 2 % β-mercaptoetanol, 0,01 % azul de Coomassie G250 em pH 6,8).

A corrida foi realizada em duas etapas: a primeira sob uma tensão de 60 V até que as bandas atingissem o gel de separação e 160V a partir daí até o final da corrida. Para identificação dos peptídeos foram utilizados os padrões de ultra baixo peso molecular, com as seguintes proteínas (em kDa): triose-fosfato isomerase (26,625); mioglobina (16,950); α-lactalbumina (14,437); aprotinina (6,512); insulina β-oxidada (3,496); bacitracina (1,423); e um padrão pré-corado com 12 proteínas de peso molecular entre 2 e 250 kDa, Após a corrida o gel foi submerso em solução fixadora (50 % metano, 10 % ácido acético) por 1 h, e corado com solução corante (0,025 % de azul de Coomassie G250 em ácido acético 10 %) por 2 h. O descoramento do gel foi realizado em solução descorante (ácido acético 10 %) por 2 h, trocando a solução a cada 30 min.

### 3.3.5.3 Distribuição da massa molecular dos peptídeos por MALDI-TOF

A distribuição de massa molecular dos peptídeos foi determinada utilizando um espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Alemanha), pertencente ao Laboratório Central de Biologia Molecular - Cebime da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis – SC).

As amostras de hidrolisado foram diluídas 10 vezes em solução de água contendo 0,1% de ácido trifluoracético. Um microlitro desta diluição foi sobreposto, em triplicata, na placa de aço polido para MALDI (Anchor Chip™ MALDI – Bruker Daltonics, Alemanha) e foi seco em temperatura ambiente. Após, um microlitro de matriz (10 mg/ml de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico – CHCA – em solução de água e acetonitrila 50% contendo 0,1 % ácido trifluoracético) foi adicionada ao hidrolisado e a mistura permaneceu novamente em temperatura ambiente para secar. Após a secagem, os espectros foram obtidos usando um espectrômetro Autoflex III Smartbeam (Bruker Daltonics, Alemanha). Os espectros foram registrados no modo refletor positivo com intensidade do laser de 40% e frequência de 100 Hz. A calibração foi feita usando peptídeos padrão de calibração cobrindo o intervalo de massa entre 700-4000 Da (Bruker Daltonics, Alemanha). As análises foram conduzidas em triplicata.

### 3.3.5.4 Atividade Antioxidante dos peptídeos

A atividade antioxidante *in vitro* dos peptídeos foi determinada usando o teste de descoloração de solução de ABTS, de acordo com o método proposto por Re et al. (1999), onde o radical ABTS<sup>•+</sup> é gerado pela oxidação do ABTS com persulfato de potássio, e é reduzido na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, promovendo a redução da absorbância devido à restauração do radical ABTS<sup>•+</sup> na forma estável.

Uma solução de ABTS 7mM (100 mL) foi misturada com solução de persulfato de potássio 2,45mM (100 mL) para gerar o radical ABTS<sup>•+</sup>, e foi mantida no escuro por 16 horas antes do uso. Antes de cada ensaio, a solução foi diluída em álcool etílico até atingir absorbância de  $0,7 \pm 0,05$  a 734 nm.

Para a construção da curva padrão de Trolox (ácido 6-hidroxi-2-5-7-8-tetrametilcromo 2-carboxílico) foram elaboradas soluções com concentrações de 100, 250, 350, 500, 650, 750, 800, 850 e 900  $\mu$ M diluídas em álcool etílico, as quais reagiram com a solução de radical ABTS<sup>•+</sup> (na proporção de 10  $\mu$ L:1 mL, respectivamente) durante 6 minutos, e a absorbância foi lida à 734 nm.



As amostras de hidrolisados reagiram com a solução de radical ABTS<sup>•+</sup> (na proporção de 20 µL:980 µL, respectivamente) durante 6 minutos e foram lidas nas mesmas condições que as amostras da curva. O espectrofotômetro foi zerado com álcool etílico PA em 734 nm e o branco considerado foi a solução de radical ABTS<sup>•+</sup>. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata.

A atividade antioxidante foi expressa em relação ao antioxidante Trolox, como Trolox Equivalente (µmol TE/mg proteína da amostra) a partir da equação da reta ajustada para a curva do padrão Trolox, de acordo com a Equação 14:

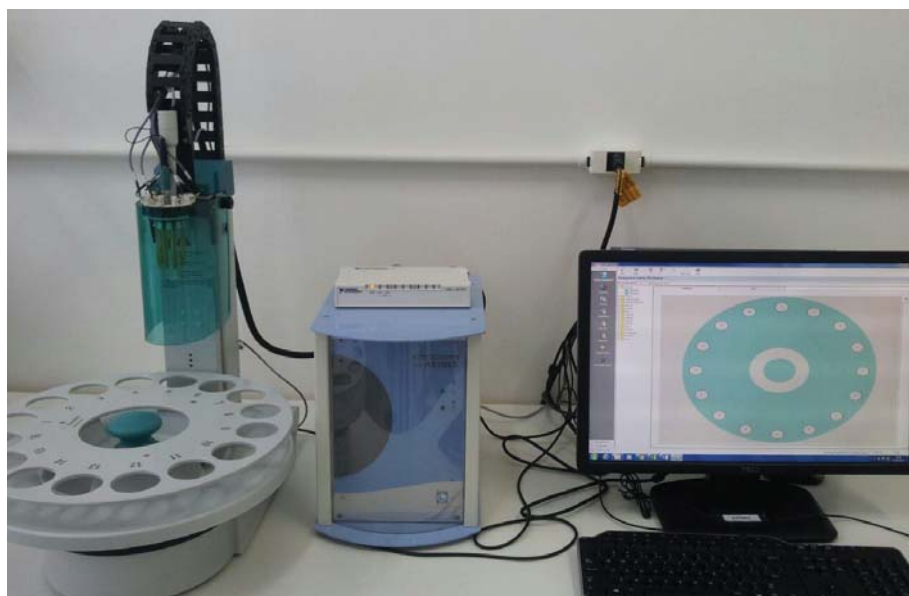
$$AA = \frac{((Abs_{734nm} * a) + b) (\mu mol TE)}{mg \text{ de proteína}} \quad (14)$$

sendo:

ABS<sub>734nm</sub>: absorvância da amostra lida a 734 nm.

### 3.3.5.5 Avaliação dos atributos de sabor dos peptídeos

A avaliação das amostras foi realizada uma língua eletrônica modelo  $\alpha$ -Astree (Alpha MOS, Toulouse, França) (Figura 7), pertencente ao Laboratório de Análise Sensorial do Instituto SENAI/SC de Tecnologia em Alimentos e Bebidas (Chapecó – SC), equipada com 07 sensores (SRS, GPS, STS, UMS, SPS, SWS e BRS - set # 5), um eletrodo de referência (Ag/AgCl) e um *autosampler* com 16 posições para béqueres de 150 mL. Os sensores possuem diferentes membranas, e dependendo da seletividade de cada sensor para um determinado gosto, ele gera uma medida potenciométrica entre cada sensor e o eletrodo de referência em um estado de equilíbrio à temperatura ambiente, que é monitorada e subsequentemente analisada utilizando análises multivariadas.

Figura 7. Língua eletrônica  $\alpha$ -Astree.

A habilidade da língua eletrônica de quantificar o amargor dos peptídeos foi avaliada utilizando soluções de L-leucina (0,001 % a 0,0075 %) em uma curva de adição, solubilizadas em uma amostra padrão de hidrolisado a 1%, correspondente àquela coletada no volume retido no REM. O reconhecimento dos atributos umami e salgado já eram validados pelo fabricante do equipamento.

O equipamento foi condicionado e calibrado antes das análises. As análises foram feitas em quintuplicata, sendo a primeira e a última descartadas, e o tempo de aquisição de dados e tempo por análise foram 120 e 240 s, respectivamente. Os sensores foram limpos com água deionizada entre as medidas. Todos os dados gerados no  $\alpha$ -Astree foram tratados utilizando estatística multivariada (análise do componente principal e análise discriminante) no software AlphaSoft. Os dados tratados relacionados aos sensores facilitam a conversão das respostas dos sensores para percepção de sabores relativos em uma escala que pode chegar entre 0 e 12, do menos intenso para mais intenso na percepção dos sabores.

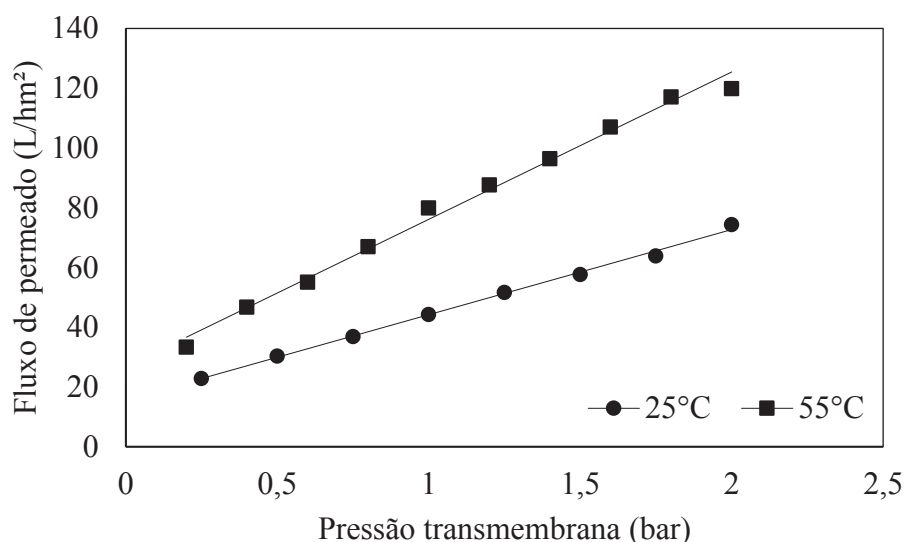
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA

#### 4.1.1 Fluxo de permeado para a água e para a solução proteica

Na caracterização inicial observou-se que o fluxo da membrana se manteve próximo do valor de referência indicado pelo fabricante de 44,9 L/hm<sup>2</sup> para a pressão de 1 bar e temperatura de 25°C, conforme Figura 8, com variação menor do que 2 %. O fluxo de permeado aumentou com o aumento da pressão e da temperatura, resultado de uma força motriz cada vez maior forçando a passagem de água através da membrana e da diminuição da viscosidade da água. Para a pressão de referência de 1 bar o fluxo foi de 44,30 L/hm<sup>2</sup> para água a 25 °C e 80 L/hm<sup>2</sup>, para água a 55°C.

Figura 8. Permeabilidade da membrana de ultrafiltração de 5 kda com água a 25°C (●) e 55°C (■).

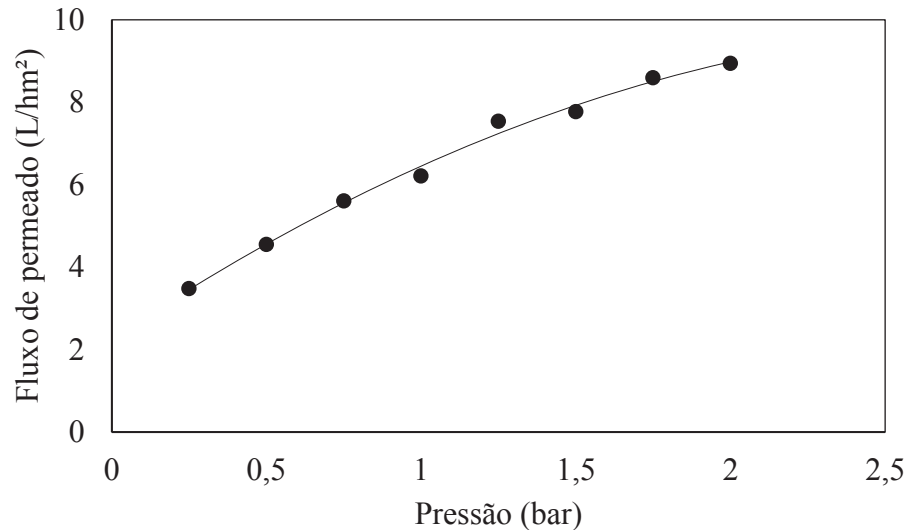


Sabe-se que para o caso de solventes puros, admitindo-se que a membrana seja inerte em relação ao solvente e que ela não deforme pela ação da pressão (compactação), o fluxo de permeado apresentará uma dependência linear com a pressão, pois não haverá interferências causadas por fenômenos como a polarização ou incrustação. Segundo Habert, Borges e Nobrega (2006), a independência do fluxo de permeado com o tempo é uma clara indicação da estabilidade mecânica da membrana, da pureza do solvente e da sua baixa interação com o material da membrana.

Comparativamente, a Figura 9 apresenta a vazão de permeado em relação a pressão transmembrana para a solução proteica (5%), sem hidrólise. Para esta avaliação utilizou-se a

mesma condição de temperatura (55 °C) e pH (8,5) que serão utilizados para o experimento com hidrólise.

Figura 9. Fluxo de permeado em relação à pressão para solução proteica de CPS (50 g/L) a 55°C, utilizando membrana de ultrafiltração de 5 kDa.



O modelo de ajustes dos pontos é polinomial, e até a pressão de 1 bar o fluxo mostra dependência mais linear com a pressão, ou seja, fenômenos como polarização e incrustação são minimizados. Por este motivo, esta pressão foi definida como a pressão de trabalho para o processo de hidrólise. Segundo Girard e Fukumoto (2000), em baixas pressões transmembrana, o fluxo é governado pela taxa na qual o solvente passa pelo material poroso. Em altas pressões, o fluxo se torna independente da pressão devido a concentração por polarização.

Na região onde o fluxo passa a ser independente da pressão começa a existir uma região onde o fluxo é controlado pela transferência de massa através da camada limite formada. Na Figura 8, a partir da pressão de 1 bar a curva toma caráter curvilíneo e é provável que, caso maiores pressões fossem aplicadas, o fluxo se tornaria estável e independente.

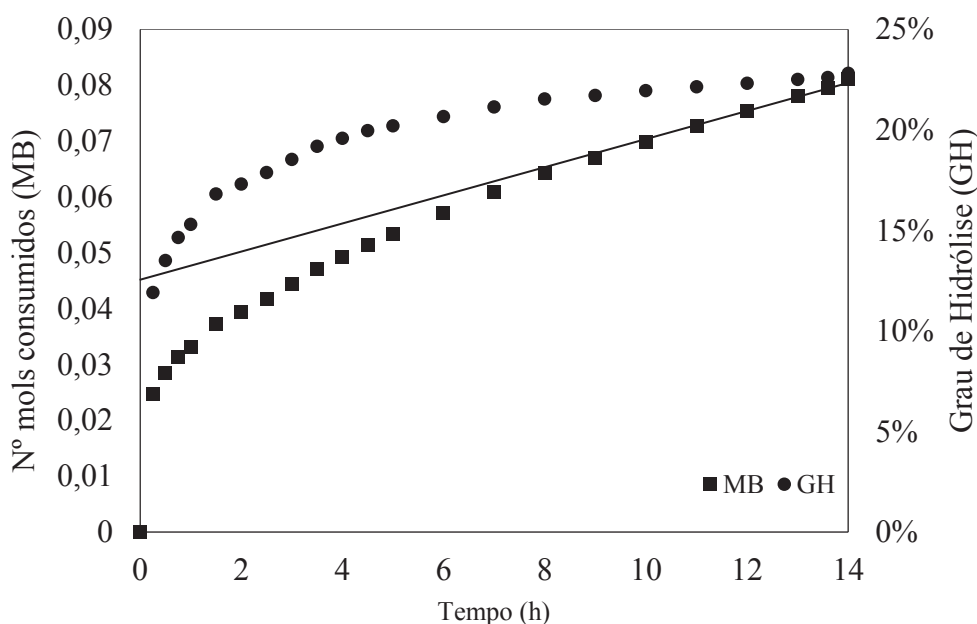
Segundo Girard e Fukumoto (2000), para soluções com macrosolutos e dispersões coloidais, o fluxo de permeado é também afetado pela alta viscosidade da camada de material concentrado depositado na superfície da membrana, camada pela qual soluto e solvente precisam passar para alcançar a membrana.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO NO BIORREATOR À MEMBRANA

### 4.2.1 Grau de hidrólise

A quantidade de mols de base consumidos para manter o pH do meio constante forneceu condições para o cálculo do GH ao longo do processo. Os dados são apresentados na Figura 10.

Figura 10. Avanço do grau de hidrólise das proteínas do CPS utilizando a enzima Alcalase® 2.4L no REM.



Ao final do processo, em 14 horas, o grau de hidrólise máximo alcançado foi de 22,81%, ou seja, 22,81% das ligações peptídicas presentes foram hidrolisadas. Guadix et al. (2006) alcançaram um GH máximo de 23% após 16 horas de operação utilizando condições semelhantes de processo, porém, com maior relação enzima:substrato, de 0,06. Pessato et al. (2016) obtiveram GH de 22,4% e 20,0% para enzima livre e imobilizada, respectivamente, em 3 horas de reação, também com maior relação enzima:substrato. Perea et al. (1993) obtiveram 16% e 20% de GH para as frações purificadas de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg respectivamente, utilizando a mesma concentração enzima:substrato utilizada neste trabalho.

A evolução da curva MB mostra uma inclinação constante a partir da 8ª hora de operação, assim como a curva de GH, o que significa uma taxa constante de hidrólise no reator. Este comportamento sugere que o consumo de base a partir deste ponto foi devido apenas a hidrólise da alimentação entrando no reator, e que todas as ligações peptídicas disponíveis na carga inicial alimentada já haviam sido hidrolisadas.

Peng, Xiong, e Kong (2009) obtiveram maior valor de GH utilizando as mesmas condições deste trabalho, porém, o comportamento da curva foi observado: um aumento muito rápido durante a primeira hora seguido por aumento lento e gradual até o final da hidrólise, num tempo de 8h. Moreno e Cuadrado (1993) sugerem que esta tendência das curvas de hidrólise pode ser atribuída ao decréscimo das ligações peptídicas disponíveis para a hidrólise e também a diminuição da atividade enzimática, entre os principais fatores.

Desta maneira, a interseção na origem desta linha de tendência deve indicar a quantidade de base necessária para promover um GH de 22,81% em relação a carga inicial de proteína alimentada. Seguindo o modelo de Adler-Nissen (1986) para um reator em batelada, utilizando-se o valor de 0,046 da interseção da linha, tem-se um GH de 22,35%, conforme mostra o cálculo abaixo:

$$GH = \frac{0,046 * 1,069}{0,5 * 50 * 0,0088} = 0,2235$$

O desvio de aproximadamente 1% pode estar associado a pequenos erros de leitura e calibração do pHmetro.

O GH mostrado na Figura 10 foi calculado conforme Guadix et al. (2006), cuja equação apresenta duas modificações em relação ao modelo de Adler-Nissen (1986). Comparativamente, o GH foi calculado seguindo o modelo de Adler-Nissen (1986) com apenas uma modificação para o processo contínuo:

$$GH = \frac{MB * \frac{1}{\alpha}}{(V_R + V_A) * S_F * h_T} \quad (15)$$

Sendo o termo  $(V_R + V_A) * S_F$  considera a massa total de proteína adicionada à reação, ou seja, a massa de proteína inicial do reator e a massa adicionada na mesma proporção da coleta de permeado. Os resultados diferiram apenas na terceira casa decimal, sendo 22,8105% para o primeiro caso e 22,8124% para o segundo caso, o que significa dizer que a modificação relacionada a massa total de proteína, conforme Equação 15, é suficientemente adequada para a predição do GH para processos contínuos.

Obviamente, o GH alcançado está intimamente relacionado com a especificidade da enzima utilizada. A Alcalase<sup>®</sup> 2.4L FG é uma serina endoprotease de ampla especificidade para ligações peptídicas internas às moléculas de proteína. Em sobreposição a esta especificidade,

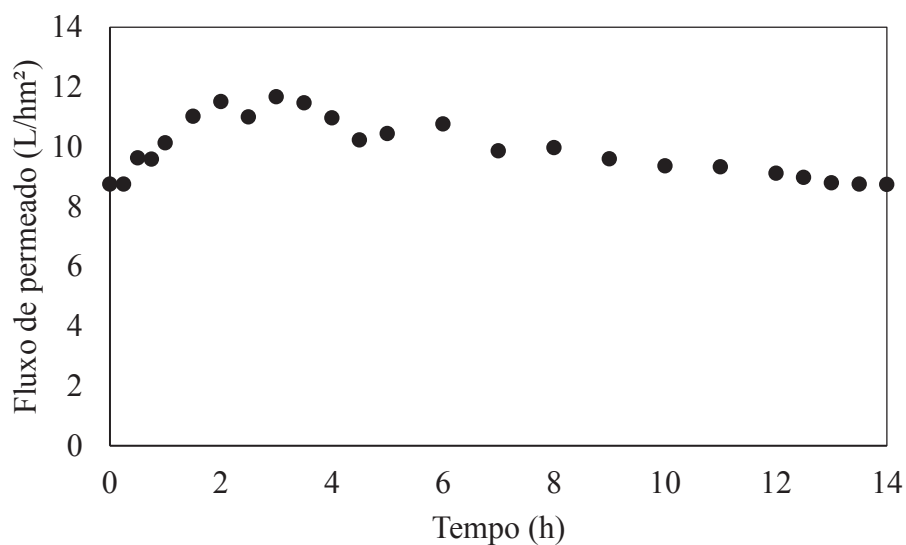
está a seletividade por algum resíduo de aminoácido, por exemplo: o *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 é uma linhagem comercial utilizada para intensificar o sabor em queijos, cujo sistema enzimático inclui endopeptidases com seletividade pós-prolina (PARKIN, FENNEMA e DAMODARAN, 2010). A Alcalase tem preferência para ligações peptídicas contendo resíduos hidrofóbicos na posição C-terminal (ADLER-NISSEN, 1986). Isto quer dizer que, mesmo que cadeias peptídicas internas estejam disponíveis para hidrólise, devido a seletividade da enzima nem todas elas serão atacadas.

Não foi possível medir o GH da hidrólise do volume retido com a Flavourzyme<sup>®</sup> pelo método do pH-stat pois o pH não se alterou durante a hidrólise. É provável que isso tenha ocorrido devido ao tamponamento do sistema. É válido observar que, na hidrólise com a Alcalase<sup>®</sup>, o permeado atingiu coloração rosada com o aumento do GH, e na hidrólise do volume retido, embora não houve variação no pH, o permeado atingiu coloração esverdeada com o tempo. Outros resultados como a atividade antioxidante e o peso molecular destes peptídeos serão avaliados.

#### 4.2.2 Fluxo de permeado no REM

O biorreator foi operado durante 14 horas, quando o fluxo de permeado atingiu a estabilidade. A evolução do fluxo de permeado é apresentada na Figura 11:

Figura 11. Evolução do fluxo de permeado no REM ao longo de 14 horas de operação contínua com hidrólise e separação de peptídeos.



O fluxo inicial de permeado foi de 8,8 L/hm<sup>2</sup> e foi superior ao fluxo de permeado não hidrolisado apresentado na Figura 6 quando a pressão de 1 bar foi aplicada (6,21 L/hm<sup>2</sup>), indicando que a hidrólise efetivamente reduziu o tamanho das proteínas, mesmo nos primeiros minutos da reação. Resultado semelhante foi relatado por Cheison, Wang e Xu (2007), afirmando que altas taxas de recuperação de proteína no permeado estão intimamente relacionadas ao seu tráfego pela membrana, e são também favorecidas pela concentração da enzima, já que a hidrólise aumentou a permeação do produto.

O fluxo de permeado mostrou um comportamento crescente incomum até a 3<sup>a</sup> hora de operação. Espera-se que o fluxo de permeado tenha comportamento decrescente, resultado gradativo da incrustação dos poros da membrana. Tal comportamento, de aumento do fluxo, não tem histórico na literatura, e muito ainda precisa ser elucidado sobre os fenômenos envolvendo as membranas e o fluxo de permeado proteico, de maneira que estes comportamentos possam ser completamente entendidos.

No entanto, algumas suposições podem ser feitas. É possível que o aumento do fluxo esteja associado ao avanço do GH e diminuição do tamanho dos peptídeos formados em tamanhos mais próximos ao corte da membrana, facilitando sua passagem, enquanto a incrustação não é significativa. Com o avanço do GH também se alteram as propriedades do substrato, como a viscosidade e a hidrofobicidade, ambos com efeito na hidrodinâmica do fluxo (LIU; XU, 1998, CHEISON; WANG; XU, 2007). Os hidrolisados são mais hidrofóbicos do que a proteína intacta e podem interagir entre eles assim como com a superfície hidrofóbica da membrana (CHERYAN, 1998).

Além da relação com o GH, o comportamento tortuoso do fluxo, principalmente no período inicial pode estar associado também à polarização por concentração. Segundo Cheison, Wang e Xu (2007), a própria camada formada pela polarização por concentração, sendo um substrato, é passível de modificação enzimática a ponto de influenciar a dinâmica do fluxo de permeado.

O fluxo de permeado é influenciado por vários fatores, como as características do substrato, as propriedades hidrodinâmicas, a pressão transmembrana, a geometria da membrana, as condições de processo e equipamentos (CHERYAN, 1998, GIRARD; FUKUMOTO, 2000, HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006). Todos estes fenômenos podem ocorrer sinergicamente no sistema, e de alguma maneira, explicar o comportamento crescente do fluxo nas primeiras horas do processo.

Somente a partir da 3<sup>a</sup> hora de operação o fluxo começa a decair de modo contínuo, característica do efeito da incrustação dos poros da membrana. Chollangi e Hossain (2007),



afirmaram que o fluxo de permeado diminui à medida que aumenta a concentração da solução, mas em concentrações abaixo da faixa de 20 a 48 g/L a queda no fluxo é menos expressiva, devido a intensidade da incrustação ser menor.

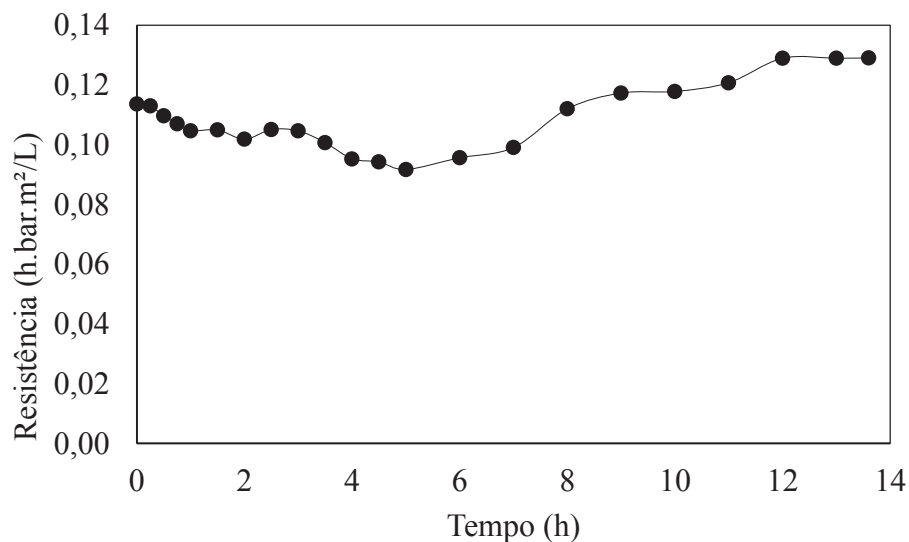
A estabilidade do fluxo a partir da 12<sup>a</sup> hora de operação justificou a interrupção do processo. Guadix et al. (2006) identificaram estabilidade no fluxo de permeado após 14 horas de operação, em sistema semelhante ao utilizado neste estudo, com membrana de 3kDa.

### 4.2.3 Resistências ao fluxo no REM

A partir da curva de permeabilidade apresentada na Figura 5, para o caso da água a 55°C, o ajuste para os pontos forneceu a equação da reta:  $y = 48,41x + 27,525$ , cujo inverso do coeficiente angular representa a resistência ao fluxo imposta pela membrana:  $R_m = 0,0207 \text{ h. bar. m}^2/\text{L}$ .

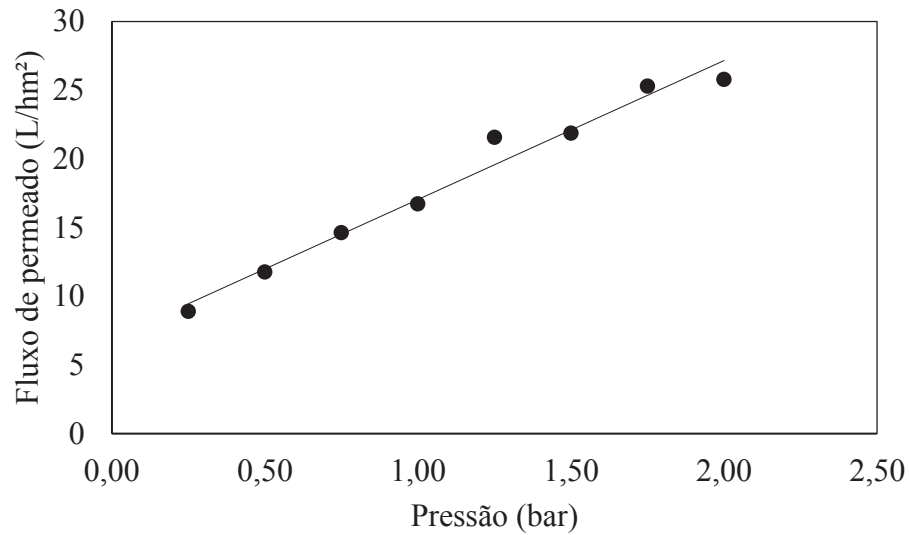
A Figura 12 apresenta a resistência total ao longo da filtração. A média dos pontos fornece resistência total  $R_T = 0,1015 \text{ h. bar. m}^2/\text{L}$ .

Figura 12. Resistência total durante a ultrafiltração da solução hidrolisada no REM.



Após o processo de hidrólise, o sistema foi enxaguado com água por 5 minutos sem reciclo e com a válvula de pressão totalmente aberta, com o objetivo de remover a camada de depósito formada pela polarização por concentração. Com este procedimento, assumiu-se  $R_p$  como zero. Após o enxague, a permeabilidade da membrana foi medida novamente com água limpa como fluido, conforme mostra a Figura 13.

Figura 13. Permeabilidade da membrana com água a 55°C após enxágue para remoção de depósitos devido à polarização por concentração.



A partir da curva de permeabilidade apresentada na Figura 13, o ajuste para os pontos forneceu a equação da reta:  $y = 10,113x + 6,937$ , cujo inverso do coeficiente angular diminuído de  $R_m$  representa a resistência ao fluxo imposta pela incrustação da membrana:

$$R_i = \frac{1}{10,113} - 0,0207 = 0,0782 \text{ h. bar. m}^2/\text{L}$$

Através da Equação 7, tem-se  $R_p$ :

$$R_p = 0,1015 - 0,0782 - 0,0207 = 0,0026 \text{ h. bar. m}^2/\text{L}$$

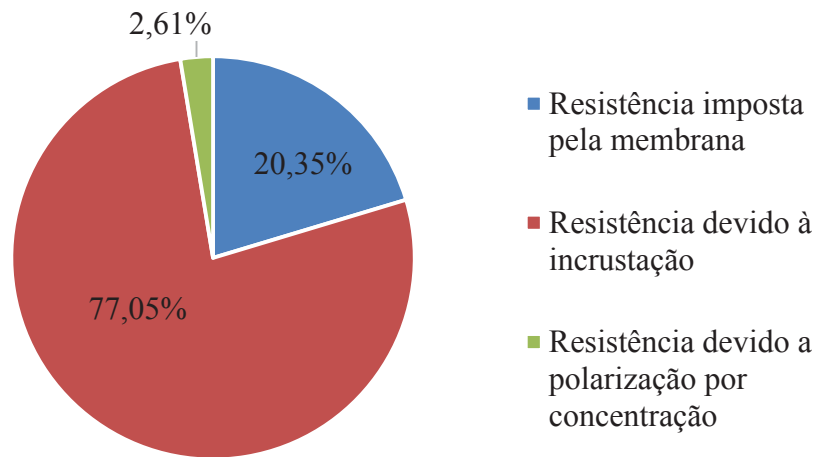
Uma observação válida é que neste modelo de cálculo a resistência foi considerada como um produto da resistência e da viscosidade do fluido. A Tabela 4 apresenta o resumo das resistências como produto (unidade h.bar.m<sup>2</sup> e Pa.s/m) e a resistência real (unidade m<sup>-1</sup>).

Tabela 4. Resistências associadas ao fluxo de permeado durante operação do REM.

Unidade	R	$R_m$	$R_i$	$R_p$
hm <sup>2</sup> bar/L	0,1015	0,0207	0,0782	0,0026
Pa.s/m	$3,66 \times 10^{10}$	$7,44 \times 10^9$	$2,82 \times 10^{10}$	$9,53 \times 10^8$
m <sup>-1</sup>	$3,64 \times 10^{13}$	$7,41 \times 10^{12}$	$2,81 \times 10^{13}$	$9,50 \times 10^{11}$

A Figura 14 mostra a contribuição de cada resistência no sistema.

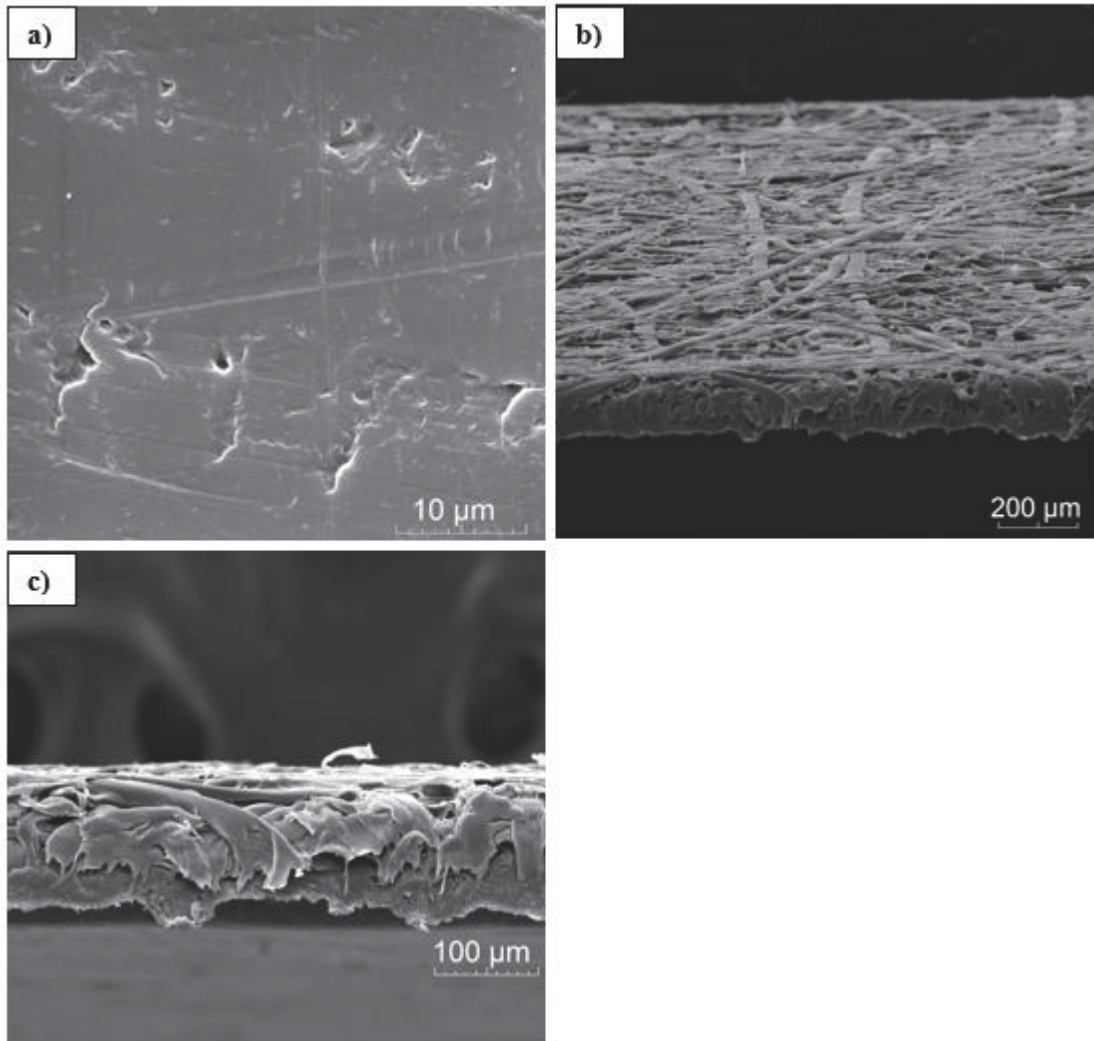
Figura 14. Contribuição de cada tipo de resistência imposta ao fluxo de permeado no REM, considerando a resistência imposta pela membrana, a resistência devido à incrustação (irreversível) e a resistência devido a polarização por concentração (reversível).



Para o processo avaliado, a resistência devido à incrustação foi a causa mais significativa para a redução do fluxo de permeado, seguida pela resistência imposta pela membrana, e enfim, pela resistência devido à polarização por concentração. Enquanto a polarização por concentração é um fenômeno fluido dinâmico, a incrustação é resultado de um fenômeno químico entre o soluto e a membrana. Além disso, em altas pressões a compactação da membrana poderia afetar a estrutura dos poros e criar uma resistência adicional a permeação (GIRARD, FUKUMOTO, 2000).

Antes do uso e após o enxágue para determinação da resistência devido à incrustação a membrana foi submetida à análise no microscópio eletrônico de varredura – MEV, cujas vistas são apresentadas na Figura 15.

Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura da membrana utilizada no REM após ultrafiltração e enxágue: a) vista da superfície da membrana após o uso; b) vista inferior da membrana após o uso; c) vista da seção transversal (fratura) da membrana após o uso.



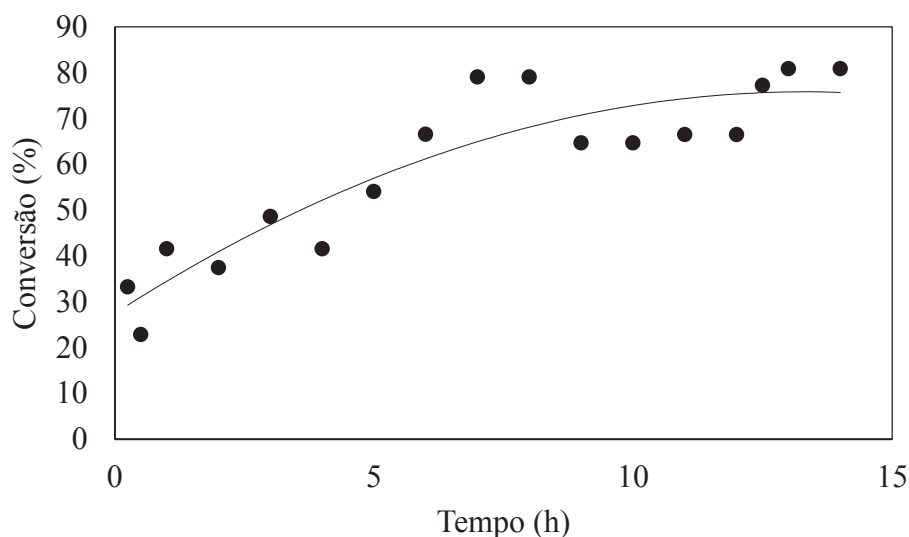
Pode-se observar na figura a) que os poros da membrana estão cobertos por uma camada de proteínas que se depositaram na sua superfície, característica da incrustação. Através do corte transversal na figura c), cuja superfície polimérica está virada para baixo, é possível ver uma fina camada (espessura aproximada de 10 μm) com coloração mais clara que representa as proteínas incrustadas.

Tais resultados corroboram com aqueles referentes ao fluxo de permeado que não mostrou redução expressiva, já que a incrustação da membrana não foi severa.

#### 4.2.4 Avaliação do processo

De acordo com a Figura 16, a conversão máxima atingida ao final do processo foi de 80,95%, ou seja, 80,95% da carga proteica alimentada foi convertida em peptídeos de peso molecular igual ou menor do que 5 kDa, que é o peso molecular de corte da membrana.

Figura 16. Evolução da conversão no REM.

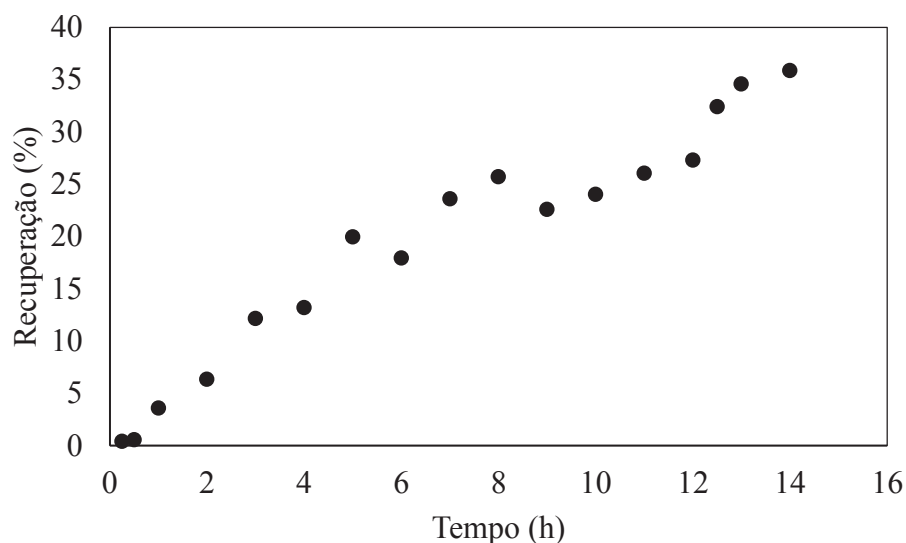


Como consequência do fenômeno de polarização por concentração, temporariamente podem ser formadas zonas e/ou camadas de polarização que impedem ou dificultam a passagem da solução hidrolisada. Nestes momentos, as moléculas tendem a ficar retidas, enquanto a água flui com mais facilidade através dos poros da membrana, e consequentemente, a concentração proteica no permeado diminui, o que explica o comportamento dos pontos na curva de conversão, hora superiores, hora inferiores a linha de tendência.

Neste sentido é possível prever que a conversão diminua a partir da estabilização, como explicam os autores Perea e Ugalde (1996) e Mannheim e Cheryan (1990) que alcançaram taxa de conversão de 83,5% e 96% depois de 90 e 60 minutos, respectivamente, ambas diminuindo constantemente a partir daí devido a incrustação da membrana e devido a inativação e/ou inibição enzimática. Guadix et al. (2006) atingiram 80% de conversão, igual ao encontrado neste trabalho, ao final de um processo de 16 horas quando o sistema atingiu estabilidade.

A Figura 17 mostra a recuperação de proteína ao longo do processo no REM, que alcançou 35,89% em 14 horas de operação, quando o sistema atingiu a estabilidade.

Figura 17. Recuperação proteica no REM.



A recuperação de proteína no permeado, assim como o rendimento do reator depende de vários fatores, como a concentração e especificidade da enzima, grau de hidrólise, condições de operação do reator, o tipo de membrana e o modo de filtração utilizado, entre outros (ADLER-NISSEN, 1986; HOYLE; MERRITT, 1994).

Dada a configuração do REM, onde a vazão da corrente de permeado é a mesma vazão da corrente de alimentação, o volume de reação permanece constante e ao final do processo o reator contém proteínas parcialmente hidrolisadas que ainda não permearam a membrana. Um balanço de massa simples, apresentado no Quadro 1, permite avaliar a distribuição proteica em cada corrente, onde a alimentação é o CPS 5% alimentado ao reator no início e ao longo do processo e a solução proteica retida é a alimentação contida no reator ao final do processo:

Quadro 1. Distribuição proteica das correntes do sistema.

Corrente	Alimentação	Permeado	Solução proteica retida
Concentração de proteína (g/L)	42,4	34,3	52,1
Volume total da corrente (L)	0,89	0,39	0,49
Total proteína (g)	38,07	13,65	25,52
<i>Total de proteína alimentada (g)</i>	38,07	-	-
<i>Total de proteína recuperada e retida (g)</i>	-	39,18	-

Quando o fluxo de permeado atinge estabilidade após o decaimento, o processo é parado a limpeza e recuperação do fluxo da membrana. Neste momento, uma das seguintes opções é adotada para a solução proteica contida no volume de reação: 1) a solução é purgada para

eliminar material suspenso e/ou não hidrolisado ou 2) a solução é utilizada para retroalimentar outro reator, reaproveitando a enzima (geralmente é necessária uma suplementação), para dar sequência ao processo.

Entretanto, algumas observações devem ser consideradas para nortear a escolha do pós-processo, como por exemplo:

- A hidrólise conduzida com a Alcalase®, uma endoprotease, atingiu o GH máximo, de acordo com as recomendações do fabricante. As ligações peptídicas disponíveis para atuação desta enzima foram hidrolisadas e, conforme o gráfico apresentado na Figura 9, o aumento no GH a partir da 8ª hora de operação foi devido apenas a hidrólise da alimentação entrando no reator.
- A ação das endoproteases expõe as ligações peptídicas antes inacessíveis para o caso das enzimas exoproteolíticas, o que facilitaria sua ação.
- A Alcalase® tem preferência para ligações peptídicas contendo resíduos hidrofóbicos na posição C-terminal, o que pode gerar peptídeos amargos. A tendência ao amargor pode ser reduzida substancialmente utilizando exoproteases.

Sendo assim parece pouco viável utilizar esta solução para retroalimentação utilizando a mesma enzima, ao passo que é uma matéria-prima rica que ainda pode ser aproveitada para obtenção de peptídeos, aumentando a recuperação proteica e o rendimento do processo.

Com este entendimento, com o objetivo de aumentar a recuperação de proteínas no sistema, a solução proteica retida no volume do reator foi direcionada para um reator batelada para um novo processo enzimático com exoprotease. Desta maneira, como toda a carga proteica alimentada é transformada em produto, parte na primeira etapa de hidrólise no REM, parte na segunda etapa de hidrólise em reator batelada, a recuperação proteica final é de 100%. Nos resultados exibidos a seguir mostram as características dos produtos de cada hidrólise.

## **4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS HIDROLISADOS**

### **4.3.1 Cálculo do comprimento médio da cadeia e da massa molecular média**

Os hidrolisados obtidos no REM em diferentes estágios de hidrólise (diferentes GH) foram caracterizados de acordo com o comprimento médio das cadeias dos peptídeos formados,

expresso em número de resíduos de aminoácidos; e o peso molecular médio, em Da, conforme mostra a Tabela 5:

Tabela 5. Caracterização molecular do hidrolisado obtido no REM.

Tempo (h)	GH (%)	Comprimento médio das cadeias (Nº de resíduos)	Massa molecular média (Da)
0,25	11,90	8,40	1008,40
0,5	13,50	7,41	888,89
0,75	14,64	6,83	819,67
1	15,30	6,54	784,31
1,5	16,81	5,95	713,86
2,5	17,88	5,59	671,14
3	18,52	5,40	647,95
4	19,59	5,10	612,56
6	20,66	4,84	580,83
9	21,72	4,60	552,49
13	22,52	4,44	532,86
14	22,81	4,38	526,09

Há um decréscimo progressivo no comprimento das cadeias e na massa à medida em que o GH aumenta. O CMC de 4,38 indica que, em média, os peptídeos formados são tetrapeptídeos com aproximadamente 4 aminoácidos e com MMM de 526 Da.

Guadix et al. (2006) relatam resultados muito semelhantes: obtiveram CMC de 4,3 para um GH máximo de 23%, sendo que 19,7% dos peptídeos gerados tinham massa molecular entre 1 e 5 kDa e 79% tinham menos de 1kDa. Perea e Ugalde (1996) obtiveram resultados de 635 Da e 4,2 para a MMM e CMC, respectivamente, sendo que 27% dos peptídeos gerados tinham massa molecular entre 1 e 3 kDa e 73% tinham menos de 1kDa.

No entanto, vale observar que, embora estes dados sirvam para dar uma noção do perfil dos peptídeos gerados, este modelo empírico não considera a existência do processo de ultrafiltração que certamente influencia na distribuição molecular do hidrolisado permeado.

### 4.3.2 Perfil de massa molecular dos peptídeos

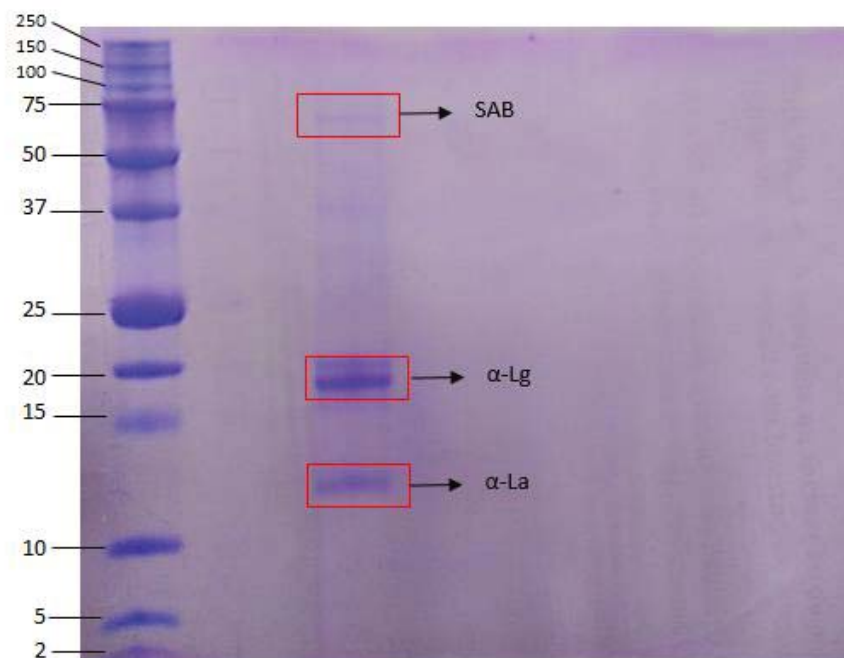
#### 4.3.2.1 Eletroforese

A fim de avaliar a massa molecular dos peptídeos obtidos no REM, amostras de CPS e hidrolisado foram submetidas ao teste de eletroforese. Na Figura 18 é apresentado o perfil



eletroforético do padrão (2 a 250 kDa), na primeira banda, e da amostra de CPS a 5%, na segunda banda.

Figura 18. Perfil eletroforético das proteínas padrão (2-250 kDa) e do CPS sem hidrólise em gel Tris-Tricina.



A segunda banda, referente ao CPS, apresentou marcações na altura de 66, 18 e 14 kDa, de cima para baixo, correspondendo as frações de SAB,  $\beta$ -Lactoglobulina e  $\alpha$ -Lactalbumina, respectivamente. A banda relativa a  $\beta$ -Lg ficou com coloração mais forte, já que esta é a proteína majoritária no soro, seguida pela  $\alpha$ -La e SAB, que aparecem em bandas mais fracas, pois se apresentam em menor concentração no soro. Ainda aparecem marcações na altura de 20 e 37 kDa mais fracamente coradas.

As bandas bem definidas indicam que as concentrações dos géis utilizadas foram adequadas para a resolução de todas as faixas do padrão, que vai de 2 até 250 kDa, e poderiam ser utilizadas para a resolução dos hidrolisados. Nesta mesma corrida foram introduzidas no gel outras 3 bandas a partir da amostra de CPS, referentes a amostras de permeado coletadas em diferentes GH, porém, nenhuma banda apareceu. É provável que a maior proporção de proteína nas amostras estava relacionada aos peptídeos menores do que 2 kDa e em função de serem muito pequenos não foi possível retê-los no gel. Além disso, como a concentração das amostras aplicadas no gel foram iguais para todas as amostras, presume-se que os peptídeos eluíram para fora do gel durante a eletroforese, como também relatou Önay-Uçar et al. (2014).

Pessato et al. (2016) avaliaram o perfil eletroforético de amostras de hidrolisado de isolado proteico de soro (não separados do meio reacional) com GH entre 17,4 e 22,4% e não identificaram peptídeos menores do que 3,5 kDa. Souza (2013) avaliou o perfil eletroforético de hidrolisados de soro em quatro diferentes estágios de GH, cujo tempo total de hidrólise foi de 400 minutos, e apenas na amostra referente ao primeiro estágio foi possível identificar peptídeos, evidenciado pela presença de uma banda difusa na região de peso molecular de 1 kDa, enquanto para as outras alíquotas não houve coloração, sugerindo que houve extensa hidrólise proteica com formação de peptídeos de peso molecular inferior a 1 kDa.

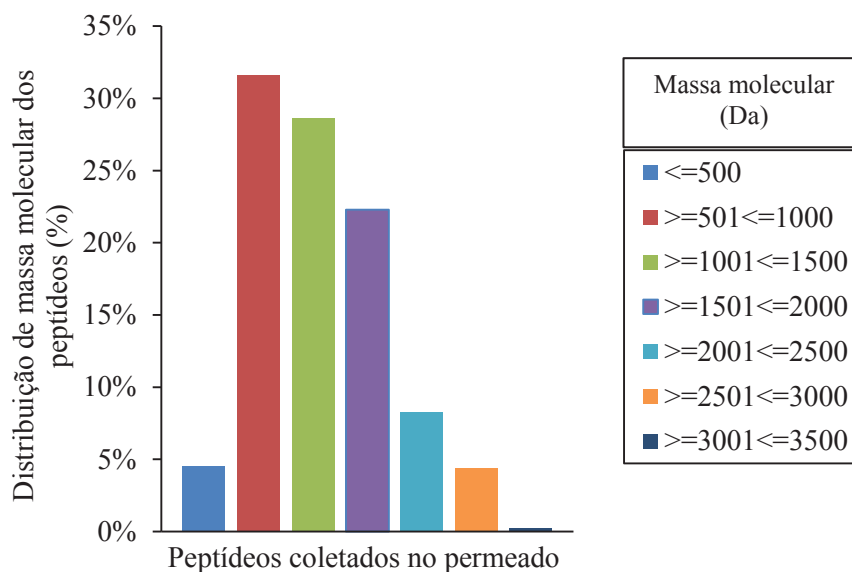
Como não foi possível avaliar o tamanho dos peptídeos através da eletroforese, optou-se por avaliá-los através de análises por MALDI-TOF.

#### *4.3.2.2 Distribuição de massa molecular dos peptídeos obtidos no REM*

Os peptídeos obtidos no REM foram analisados por MALDI-TOF para identificação das suas massas moleculares, cujos espectros com o perfil  $m/z$  das amostras são apresentados no Apêndice B e o quadro de dados sumarizados no Apêndice C. Vale destacar que as amostras não foram fracionadas ou purificadas antes da análise, ou seja, as massas identificadas são resultado de uma mistura complexa de peptídeos após hidrólise.

A distribuição das massas confirma a atuação da enzima e a eficiência da membrana, já que as massas dos peptídeos detectados no permeado foram compatíveis com a massa molecular de corte da membrana, sendo que nenhum peptídeo de 5 kDa ou maior foi detectado. A Figura 19 mostra de maneira sintetizada a distribuição dos tamanhos dos peptídeos gerados no processo, durante as 14 horas de operação do REM.

Figura 19. Distribuição das massas dos peptídeos coletados no permeado do REM durante as 14 horas de operação.

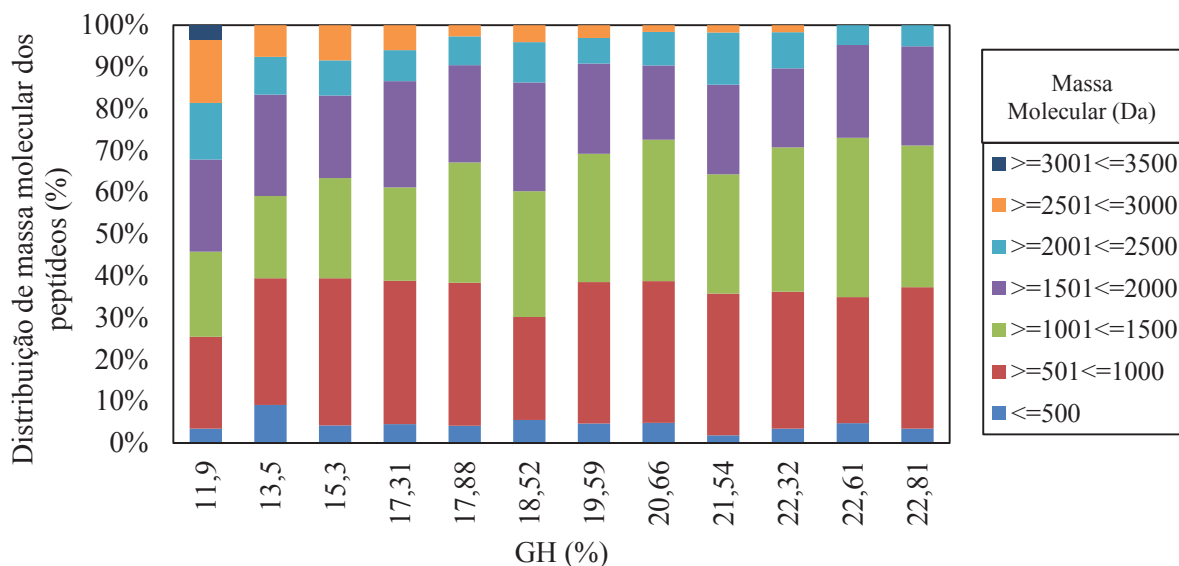


A maior parte dos peptídeos gerados, 30,41%, têm massa entre 501 e 1000 Da, sendo que a faixa entre 501 e 1500 Da corresponde a 55,15% de todos os peptídeos gerados.

Na faixa de massa apontada como <=500 Da, a menor massa molecular detectada foi de 437 m/z. Como investigação, as amostras correspondentes aos GH de 11,90%, 20,66% e 22,81% foram submetidas a análise com padrões entre 0 a 100 Da e 100 a 200Da, conforme mostram as Figuras do Apêndice B 1) e 2), B 10) e 11) e B 16) e 17), respectivamente, e todos os picos detectados nas amostras (azul) foram encobertos pelos picos da matriz (laranja), ou seja, não foram detectados aminoácidos livres ou peptídeos com massa abaixo de 437 m/z.

A Figura 20 mostra a distribuição de massas moleculares dos peptídeos em relação ao grau de hidrólise durante a operação do REM.

Figura 20. Distribuição de massas moleculares dos peptídeos do permeado em função do Grau de Hidrólise.



De modo geral, é possível perceber que à medida que o GH aumenta, diminui o tamanho dos peptídeos. Os maiores peptídeos, com massas de 2870,06, 2887,03, 3410,35 e 3428,38 m/z, foram detectados apenas na amostra 1, correspondente a um GH de 11,90%. A partir da amostra 2 até a 23, com GH entre 13,50% e 22,81%, nenhum peptídeo com massa acima de 2827,19 m/z foi detectado.

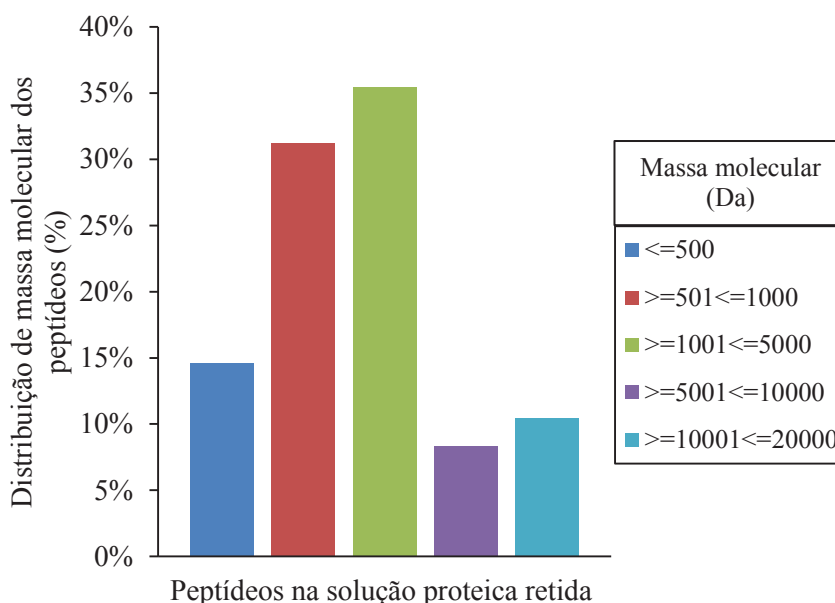
Através dos espectros do Apêndice B é possível perceber que à medida que o GH aumenta, aumentam a intensidade dos picos referentes aos peptídeos de menor massa. O peptídeo de massa 437 m/z está presente em todos os espectros com o pico de maior intensidade, que aumenta gradualmente chegando ao seu máximo na amostra 8, indicando que há maior concentração deste peptídeo no permeado neste momento. Este comportamento dos picos comprova que a enzima atua em sítios específicos tais que formam o mesmo peptídeo.

Os peptídeos de massa 1119 e 805 m/z cujos picos apresentam maior intensidade nas amostras iniciais, entre 1 e 4, gradualmente diminuem até que desaparecem a partir das amostras 10 e 13, respectivamente, indicando que estas moléculas foram hidrolisadas em massas menores.

Alguns peptídeos, como os de massa 582, 625, 656 e 674 m/z estão presentes em todas as amostras analisadas sugerindo que tais peptídeos atingiram uma sequência de aminoácidos e configuração tal que a enzima não tem mais afinidade para atuação, e assim eles são mantidos e se acumulam.

A Figura 21 apresenta a distribuição de massa molecular dos peptídeos da solução proteica retida do REM ao final da operação.

Figura 21. Distribuição das massas das proteínas e peptídeos na solução proteica retida no REM ao final do processo.



A distribuição de massas na solução retida é mais ampla do que o permeado pois com alimentação constante o meio contém proteínas parcialmente hidrolisadas, embora em concentrações menores, já que apenas 19% dos peptídeos foram detectados na faixa de 5001 a 20000 Da. 67% dos peptídeos tem massa entre 501 e 5000 Da e 15% tem massa abaixo de 500 Da. Toda a carga proteica apresenta-se parcialmente hidrolisada, o que justificou o aproveitamento da solução retida para recuperação de peptídeos, como já mencionado no texto.

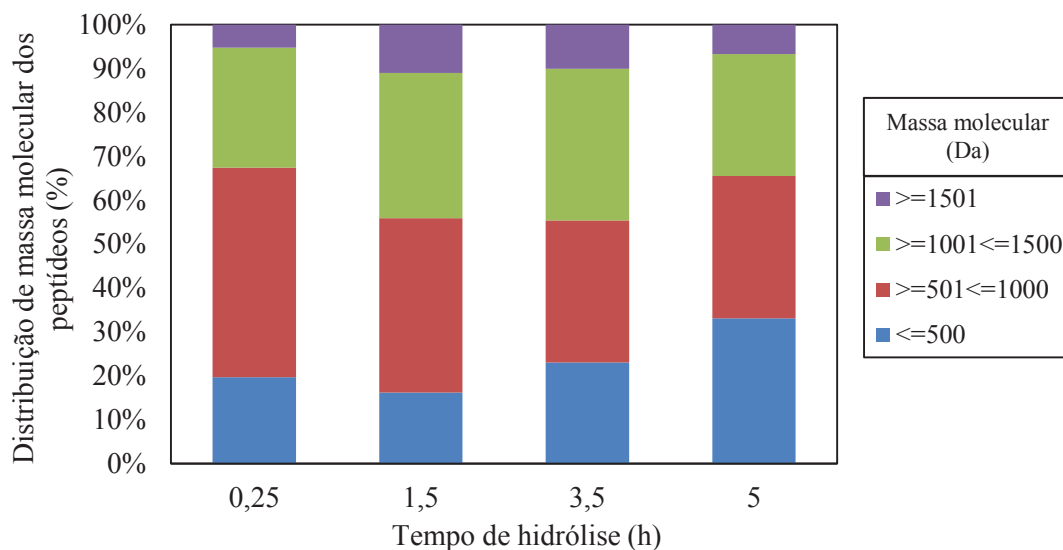
#### 4.3.2.3 Distribuição de massa molecular de peptídeos obtidos no tratamento da solução proteica retida do REM com exoprotease

A Flavourzyme® é uma exopeptidase, cuja enzima declarada é aminopeptidase, que libera aminoácidos por hidrólise da ligação peptídica N-terminal (NOVOZYMES). Dada a especificidade da enzima, ela cliva um aminoácido por vez, o que leva a formação de aminoácidos livres e pequenos peptídeos.

As amostras obtidas pela ação da Flavourzyme® foram avaliadas por MALDI-TOF para determinação das massas moleculares dos peptídeos originados. Os espectros com o perfil m/z das amostras são apresentados no Apêndice D e o quadro de dados sumarizados no Apêndice E. O intervalo de massas avaliado foi de até 5000 Da, no entanto, não houve detecção acima de 2000 Da, e por isso os espectros foram restringidos até esse limite.

A Figura 22 mostra a distribuição das massas moleculares dos peptídeos obtidos pelo tratamento do volume retido no REM com a Flavourzyme, em relação ao tempo de hidrólise, já que o GH não pôde ser medido neste processo.

Figura 22. Distribuição molecular dos peptídeos gerados a partir da hidrólise do volume retido no REM com exoprotease.



A medida que o processo avança, 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 (Apêndice D) a maior concentração de peptídeos está na faixa de até 500 Da, resultado da presença de aminoácidos livres e dipeptídeos, principalmente.

O interesse na obtenção de pequenos peptídeos, di-, tri- e tetrapeptídeos, está relacionado à sua biodisponibilidade, uma vez que podem ser capazes de sobreviver à digestão gastrointestinal. Le Maux et al. (2015) avaliaram o efeito de hidrolisado de soro nanofiltrado em membrana de 200 Da na inibição da enzima dipeptidil peptidase IV e encontraram que a atividade do hidrolisado permeado (<200 Da) foi significativamente maior comparada a atividade do hidrolisado não filtrado e do retentado. No permeado os autores conseguiram identificar 16 compostos, sendo oito aminoácidos, sete dipeptídeos e um tetrapeptídeo (447.295 Da), confirmando a importância de pequenos peptídeos na ação inibitória.

Silva et al. (2009) avaliaram o perfil molecular de peptídeos de soro gerados por diferentes enzimas após 5 horas de hidrólise em condições ótimas. Duas das enzimas utilizadas

assemelham-se às utilizadas neste trabalho: a Protezyn<sup>®</sup> L, uma serino protease cuja origem é o *Bacillus subtilis*, semelhante à Alcalase<sup>®</sup>, e a Flavourzyme<sup>®</sup>. Os peptídeos obtidos com a Protezyn<sup>®</sup> apresentaram maior teor de oligopeptídeos, sendo que a fração com mais de 7 resíduos de aminoácidos representou 72,25%, a fração entre 6 e 4 resíduos representou 24,23%, a fração entre 3 e 2 resíduos representou 2,81% e os aminoácidos livres representaram 0,70% (% nmols). Já nos peptídeos obtidos com a Flavourzyme, a fração de oligopeptídeos com mais de 7 resíduos representou 18,76%, a fração entre 6 e 4 resíduos representou 46,66%, a fração entre 3 e 2 resíduos representou 16,14% e a fração de aminoácidos livres representou 18,43%. Tais resultados estão de acordo com os observados neste trabalho, onde não foi possível detectar aminoácidos livres nos peptídeos gerados pela Alcalase<sup>®</sup>, enquanto que aqueles gerados após o tratamento do volume retido no REM com a Flavourzyme apresentaram massas menores do que 200 Da.

#### 4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos de hidrolisados de proteínas exercem atividade antioxidante através da inibição de peroxidação lipídica, quelação de íons metálicos e através do mecanismo de captura de radicais livres (PHELAN et al., 2009, ÖNAY-UÇAR et al., 2014), este último avaliado neste trabalho pelo método de ABTS, utilizando-se Trolox como padrão de referência.

A atividade antioxidante dos peptídeos obtidos no REM mostrou tendência de aumento com o aumento do GH, conforme mostra a Figura 23. Todas amostras mostraram aumento na AA quando comparadas com a proteína não hidrolisada (CPS 5%, tempo 0 h apresentado na Figura 23) que apresentou AA de 60  $\mu\text{mol TE/g}$  de proteína. Especificamente, a AA aumentou cerca de 9 vezes com a hidrólise enzimática (a partir da média dos resultados).

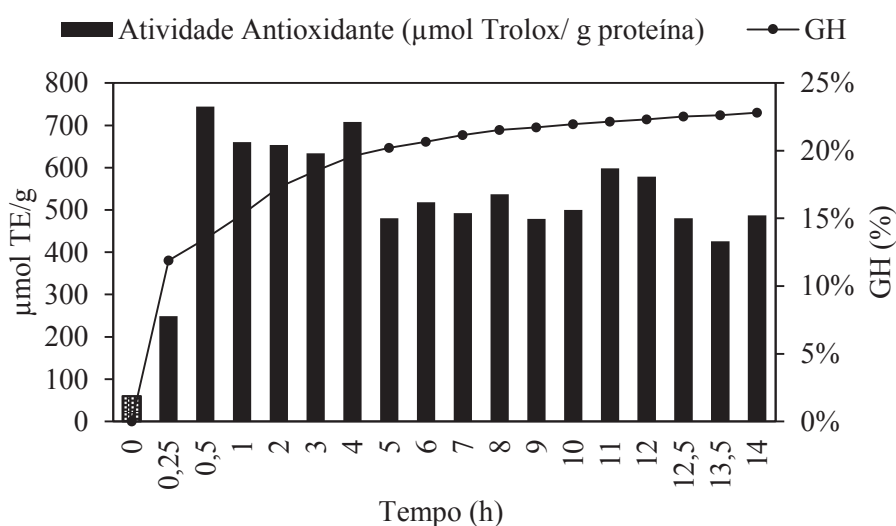
Contudo, depois de um GH de aproximadamente 15% os valores de AA oscilaram, mantendo uma média de 608,25  $\mu\text{mol TE/g}$  até 22,4% de GH (até 4 horas de processo) e 507,10  $\mu\text{mol TE/g}$  entre 23,2 e 25,6% de GH (a partir de 5 horas até o final do processo). Tais resultados sugerem que, para as condições de substrato, enzima e relação enzima:substrato utilizadas neste trabalho, pode haver um GH crítico a partir do qual a AA é pouco ou negativamente influenciada e que pode não ser necessário uma extensa hidrólise para a formação de peptídeos com potencial antioxidante, interpretação também relatada nas discussões de Cheung et al. (2012).

Comportamento similar foi relatado pelos autores Önay-Uçar et al. (2014), Peng, Xiong, e Kong (2009) e Corrêa et al. (2014), que encontraram AA 3,2 vezes maior no hidrolisado do que na proteína de soro não hidrolisada, no entanto, embora a maior AA foi alcançada no maior GH, após 1 hora até 6 horas de hidrólise as diferenças não foram significativas. Os autores avaliaram também a capacidade de quelação de ferro, e ambos apresentaram aumento na resposta quando comparado a proteína não hidrolisada.

Segundo Sarmadi e Ismail (2010), a atividade antioxidante de peptídeos gerados através da hidrólise de proteínas está relacionada com a exposição de grupos hidrofóbicos antes inativos na sequência original da proteína intacta, e isto explica a maior AA dos peptídeos em relação ao CPS, assim como o aumento da AA com o aumento do GH, quando mais resíduos são expostos.

Cheung et al. (2012) avaliaram a atividade antioxidante de hidrolisados de pescado com diferentes proteases através do método ABTS e todas as amostras apresentaram alto potencial antioxidante, independentemente do tipo de protease, concluindo que o tamanho molecular dos peptídeos é o principal aspecto contribuinte para a sua AA. Assim, a hidrólise é essencial para a ativação da atividade antioxidante das proteínas do soro.

Figura 23. Atividade antioxidante dos peptídeos coletados no permeado do Rem de acordo com o Grau de Hidrólise.

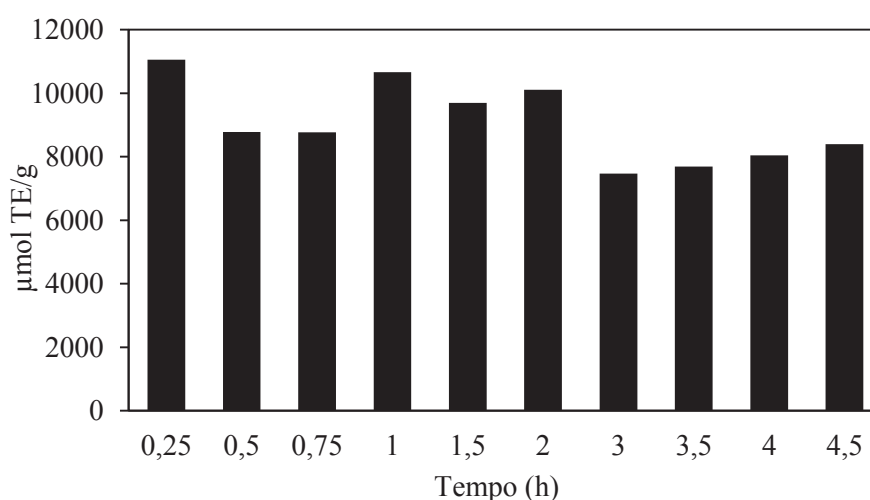


A atividade antioxidante dos peptídeos obtidos pela hidrólise do volume retido no REM com a Flavourzyme®, Figura 24, foi significativamente maior (aprox. 16 vezes) comparada a atividade obtida pela hidrólise com a Alcalase®. A maior AA dos peptídeos obtidos pela ação



da Flavourzyme® em relação à Alcalase® reflete a maior acessibilidade dos pequenos peptídeos aos radicais e ao grau de liberdade de possíveis resíduos de aminoácidos responsáveis pela ação antioxidante. De fato, ainda que a hidrólise sob ação da Flavourzyme® tenha produzido peptídeos com maior atividade antioxidante, deve-se observar que grande parte deste potencial vem da primeira etapa de hidrólise conduzida com a Alcalase®. Zhang et al., (2013) isolaram e identificaram peptídeos antioxidantes derivados de hidrolisados proteicos de soro por diferentes enzimas e observaram que o hidrolisado gerado pela Alcalase 2.4L® apresentou a maior atividade antioxidante, medida pelo método DPPH.

Figura 24. Atividade antioxidante de peptídeos obtidos pela hidrólise do volume retido no REM com a Flavourzyme®.



Diferente do observado na primeira hidrólise (Fig. 23), os altos valores de AA (Fig. 234) foram alcançados logo no início do processo, porém, é possível identificar a mesma tendência de diminuição e estabilização, neste caso, a partir do tempo de 3 horas. Claramente, não é só o tamanho dos peptídeos os responsáveis pelo seu potencial antioxidante, já que, neste caso, o aumento no GH, tanto para a hidrólise com a Alcalase® quanto com a Flavourzyme® não produziu igual resposta na AA.

Cheung et al. (2012) utilizaram uma coluna cromatográfica para separar frações de hidrolisados de pescado entre três diferentes tamanhos, sendo de 2000 a 3600 Da a fração I, de 1400 a 2000 Da a fração II e <1400 Da a fração III. A fração III apresentou aproximadamente o dobro da atividade de captura de radicais ABTS quando comparada às frações I e II, confirmando que o tamanho dos peptídeos abaixo de 1400 Da é o fator dominante para a atividade antioxidante. No entanto, variações na atividade de captura de radicais ABTS de

diferentes hidrolisados (diferentes enzimas) na fração III sugere que a composição peptídica também exerce algum efeito na atividade antioxidante.

Souza (2013) avaliou a atividade antioxidante de peptídeos de soro produzidos a partir da Alcalase e da Flavourzyme em diferentes graus de hidrólise, pelo método ABTS, e encontrou maiores valores para os peptídeos produzidos com a Alcalase (998 a 6290  $\mu\text{mol}$  de TE) em relação aos produzidos pela Flavourzyme (597 a 1092  $\mu\text{mol}$  de TE) e aos produzidos pela mistura das duas enzimas (913 a 2678  $\mu\text{mol}$  de TE). Como neste caso a autora promoveu a hidrólise separadamente para cada enzima, a Flavourzyme, que age apenas nas extremidades da cadeia polipeptídica formou peptídeos de maior massa molecular, enquanto a Alcalase, atuando em sítios específicos no interior da cadeia polipeptídica, foi responsável pela geração de peptídeos de menor massa molecular, e assim, maior atividade. Neste trabalho, como a hidrólise com a Flavourzyme foi conduzida após a hidrólise com a Alcalase, os peptídeos obtidos previsivelmente foram menores e apresentaram maior atividade antioxidante.

Tais resultados indicam que outros fatores, como o substrato, a especificidade da enzima, a composição dos peptídeos, ou seja, a sequência aminoacídica e a hidrofobicidade também influenciam a AA dos peptídeos produzidos. Além disso, vários autores têm demonstrado que aminoácidos hidrofóbicos entre a sequências são um fator chave na habilidade dos peptídeos de sequestrar radicais (CHEUNG et al., 2012, AHMED et al., 2015, SARMADI e ISMAIL,2010).

Zhang et al. (2013) encontraram maior atividade antioxidante em hidrolisados de soro dessalinizados em resina de adsorção macroporosa do que os hidrolisados que não receberam este tratamento, e concluíram que a maior atividade se deveu a maior concentração de aminoácidos hidrofóbicos (Tyr, Val, Met, Phe, Ile, Leu e Pro) nas frações adsorvidas.

Corrêa, et al. (2014) isolaram uma fração de hidrolisado com a maior atividade antioxidante e identificaram como sendo um peptídeo derivado da  $\beta$ -lactoglobulina, anfifático, com um resíduo hidrofóbico na posição N-terminal seguido alternadamente de resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos, cuja sequência foi determinada LAFNPTQLEGQCHV.

Através dos resultados, os autores indicam que os mecanismos de sequestro de radicais de peptídeos bioativos podem estar relacionados com a prevalência de resíduos de aminoácidos não polares, tais como Leu, Ala, Pro, Val e Phe. Similarmente, AHMED et al. (2015) identificaram peptídeos com alta atividade antioxidante que continham abundância de resíduos hidrofóbicos como Tyr, Phe, Pro, Ile, e Leu entremeados com resíduos polares, cuja natureza anfifática parece melhorar a atividade sequestrante de radicais através do aumento da solubilidade do peptídeo, facilitando a interação e troca de prótons com as espécies radicais.

AHMED et al. (2015) demonstraram que em peptídeos que apresentaram maior AA, o número de resíduos hidrofóbicos na sua sequência é maior do que naqueles peptídeos com baixa atividade, e que algumas sequências específicas envolvendo resíduos de Leu, Pro, His e Ser/Thr e particularmente a presença de Pro e Leu nas posições N ou C-terminal podem contribuir efetivamente para a atividade dos peptídeos.

De um modo geral é possível verificar que a hidrólise do volume retido com a Flavourzyme®, dada a sua ação exoproteolítica, além de diminuir o tamanho da cadeia peptídica, pode ter exposto resíduos hidrofóbicos, o que contribuiu para a maior atividade antioxidante destes peptídeos comparado aos peptídeos gerados pela ação da Alcalase 2.4L®, somente.

A atividade antioxidante dos hidrolisados de soro de leite representam uma alternativa para atender à demanda crescente por antioxidantes naturais visando a saúde humana e a qualidade dos alimentos (CORRÊA et al., 2014).

Em resumo, pode-se dizer que os peptídeos gerados através dos dois processos agem como doadores de hidrogênio que podem reduzir os radicais livres e convertê-los em moléculas estáveis (AHMED et al., 2015, RE et al., 1999). Os peptídeos obtidos pela hidrólise do CPS com a Alcalase® no REM ou pela hidrólise do volume retido com a Flavourzyme® podem ser aplicados em alimentos para melhorar as suas propriedades antioxidantes, ainda que sejam necessários mais estudos para avaliar o comportamento destes peptídeos em diferentes matrizes alimentícias, como matrizes lipídicas, por exemplo.

#### **4.5 AVALIAÇÃO DO AMARGOR E OUTROS ATRIBUTOS DE SABOR DOS PEPTÍDEOS**

Embora a presença de resíduos hidrofóbicos possa favorecer o potencial antioxidante dos peptídeos, eles também são responsáveis pelo seu amargor (SUJITH; HYMAVATHI, 2011). Muitos L-aminoácidos, tais como Arg, Pro, Leu, Phe, Trp e Ile, são amargos e apresentam-se como hidrofóbicos (RAKSAKULTHAI; HAARD, 2003), sendo que a Leucina é o aminoácido com a segunda maior concentração nas proteínas do soro de leite (LINDQVIST, M., 2010 e HARAGUCHI; ABREU e PAULA, 2006).

Liu, Jiang e Peterson (2014) identificaram 4 principais peptídeos responsáveis pelo amargor de hidrolisados de proteínas do soro, sendo estes: YGLF, IPA VF, LLF e YPFPGPIP N, originados da  $\alpha$ -lactalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, soro albumina e  $\beta$ -caseína, respectivamente,

em concentrações de 0,66, 0,58, 1,33 e 2,64 g/kg (seco), respectivamente. A recombinação dos quatro peptídeos foi capaz de explicar 88% da intensidade do amargor de uma solução 10% de hidrolisado de proteína de soro, sendo que os dois peptídeos com as menores concentrações foram reportados como os mais potentes (YGLF e IPA VF) com o maior amargor por unidade de concentração. Assim, é necessário avaliar os hidrolisados de soro de acordo com sua característica sensorial antes da aplicação em produtos alimentícios.

Por tais motivos, a L-Leucina foi utilizada como referência para a avaliação do amargor dos peptídeos gerados no REM, pela ação da Alcalase<sup>®</sup> (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<sup>®</sup> (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 2.

Quadro 2. Codificação das amostras para análise na língua eletrônica.

Amostras obtidas no REM pela ação da Alcalase <sup>®</sup>	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 <sup>®</sup>	Código da amostra	Tempo de processo (h)
	321	0,25
	325	1,5
	329	3,5
	3211	5

As Figuras 25 e 26 mostram a análise de componente principal por amostra e por grupo de enzima. Na avaliação por amostras é possível identificar que os peptídeos produzidos pela ação da Alcalase<sup>®</sup> (311 a 3123) são diferentes dos produzidos pela ação consecutiva da Flavourzyme<sup>®</sup> (321 a 3211) pois foram posicionados em eixos diferentes, com índice de discriminação igual a 3. A Figura 26 evidencia que todas as amostras obtidas pela enzima 1 – Alcalase<sup>®</sup> (E1) e as amostras obtidas pela ação da enzima 2 – Flavourzyme<sup>®</sup> (E2), foram agrupadas em grupos diferentes, com índice de discriminação de 21.

Figura 25. Análise de Componente principal nas amostras de hidrolisados obtidos no REM pela ação da Alcalase® e na hidrólise do volume retido do REM pela ação da Flavourzyme® - índice de discriminação igual a 3.

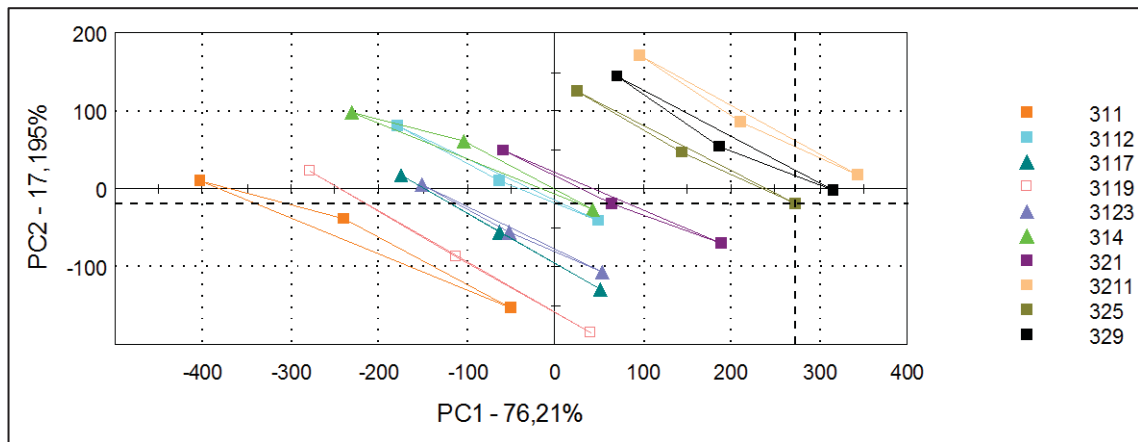
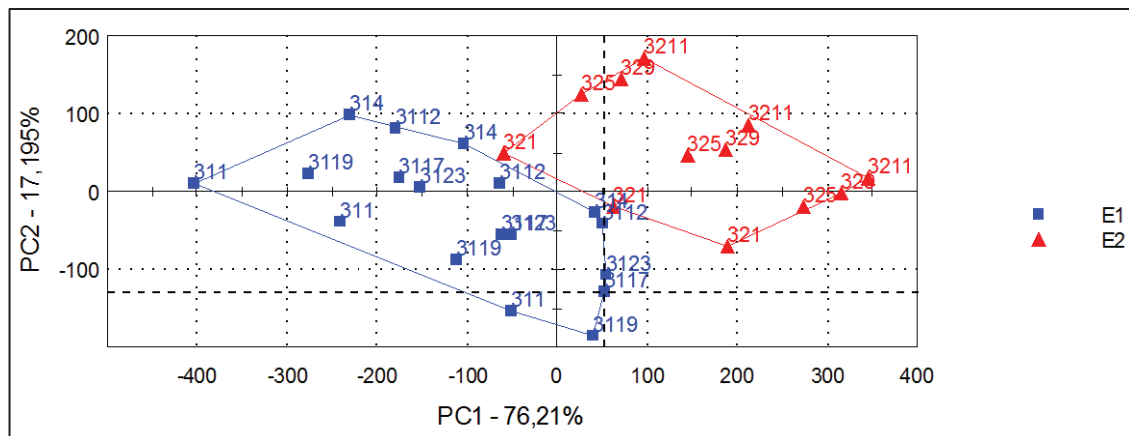


Figura 26. Análise de Componente principal nas amostras de hidrolisados obtidos no REM pela ação da Alcalase® e na hidrólise do volume retido do REM pela ação da Flavourzyme® - índice de discriminação igual a 21.

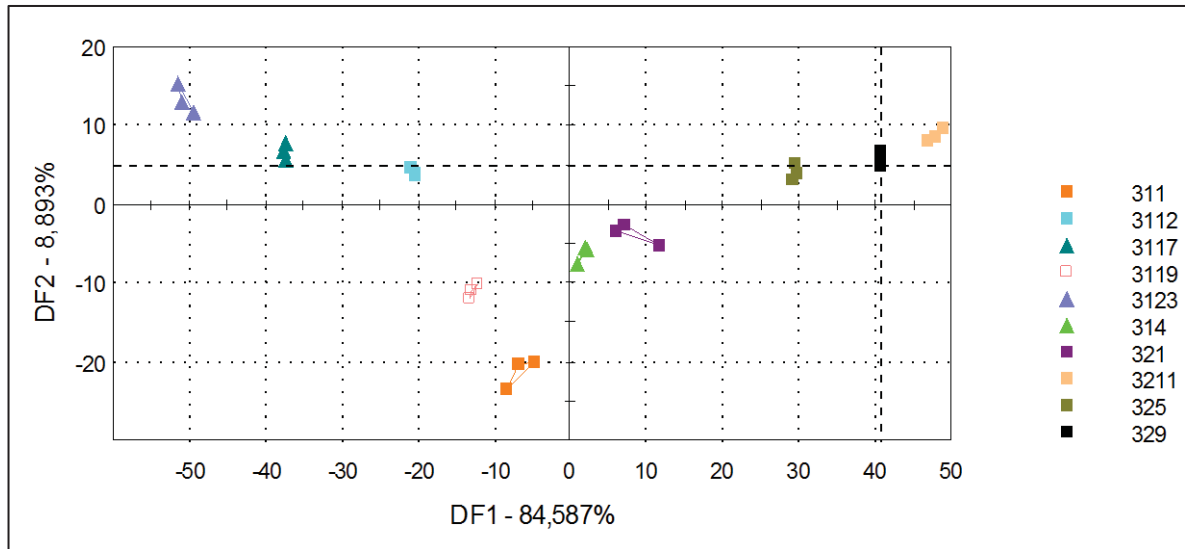


Na Figura 26 cada amostra é separada uma das outras, indicando que a língua eletrônica foi capaz de discriminar amostras de diferentes graus de hidrólise, e a formação dos grupos em eixos diferentes mostra que a língua também foi capaz de distinguir entre os hidrolisados de cada tipo de enzima. Newman et al. (2014) mostraram que a língua eletrônica pôde distinguir hidrolisados obtidos a partir de CPS e de caseinato de sódio, cujas amostras com diferentes graus de hidrólise também foram discriminadas pelo equipamento. Os autores afirmam que tais resultados são uma indicação da habilidade da língua eletrônica em separar hidrolisados de proteínas do leite e de caseinatos dos hidrolisados de soro. Além do mais, estes resultados

mostram que a língua eletrônica pode ser empregada no controle de qualidade dos produtos, como no controle de contaminação e controle de padrão dos produtos.

A análise discriminante das amostras é apresentada na Figura 27.

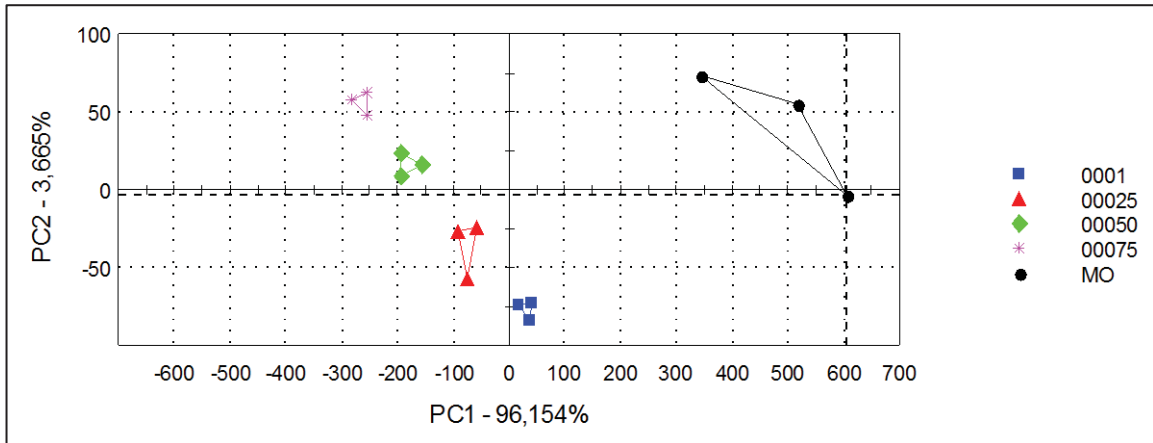
Figura 27. Análise discriminante das amostras.



Novamente, as amostras foram agrupadas em dois eixos, sendo que as amostras E1 foram separadas das amostras da E2. As amostras 325, 329 e 3211 foram agrupadas no quadrante 1, enquanto as amostra 314 e 321 foram agrupadas no mesmo quadrante, e por isso pode-se inferir que estas duas amostras são semelhantes na composição de peptídeos e aminoácidos. Tais amostras foram coletadas dentro da primeira hora de cada etapa do processo.

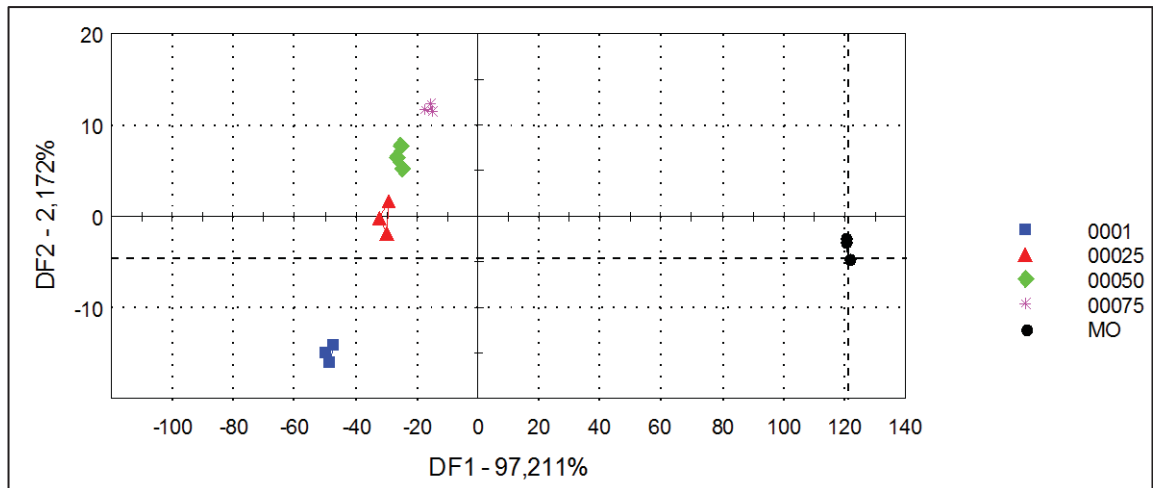
A Figura 28 mostra a análise de componente principal nos pontos da curva de adição, cujo índice de discriminação foi de 86, onde MO representa a matriz e os pontos coloridos representam as amostras de matriz que sofreram adição da L-leucina, em diferentes concentrações (0,001% até 0,0075%).

Figura 28. Análise de componente principal nos pontos da curva de adição de L-leucina.



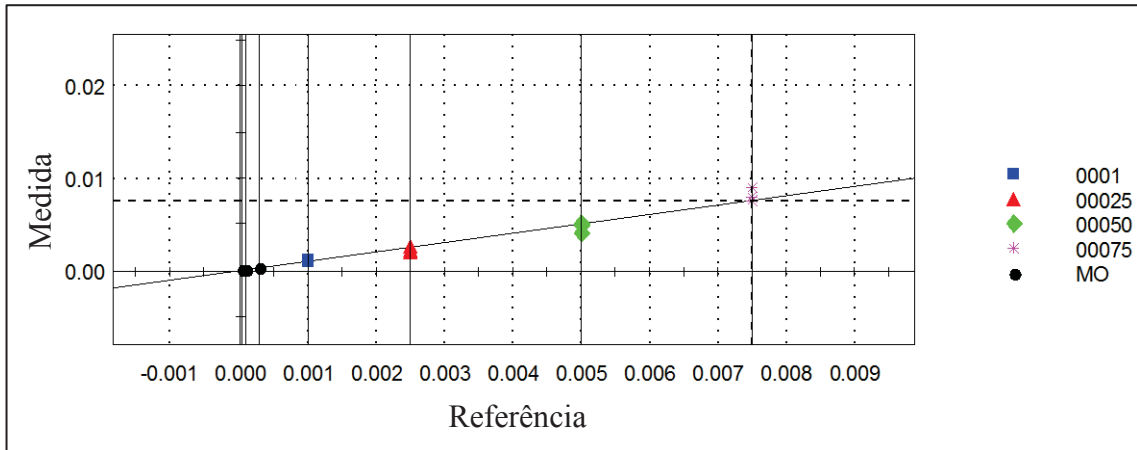
A Figura 29 mostra a análise discriminante dos pontos da curva de adição.

Figura 29. Análise discriminante dos pontos da curva de adição.



A Figura 30 mostra o coeficiente de correlação dos pontos da curva de adição, cujo  $R^2$  foi de 0,9728.

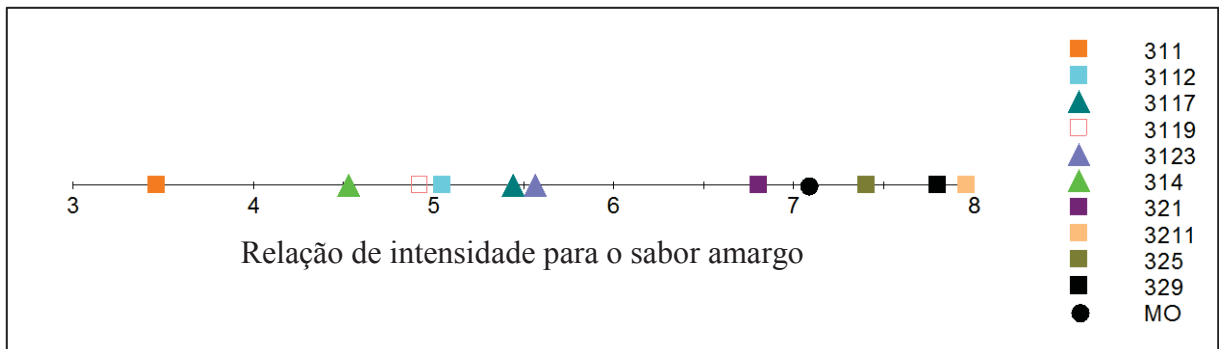
Figura 30. Coeficiente de correlação dos pontos da curva de adição de L-leucina.



O comportamento linear com alto coeficiente de correlação,  $R^2 = 0,9728$ , 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 31.

Figura 31. Intensidade relativa do sabor amargo das amostras obtidas no permeado do REM e na hidrólise do volume retido no REM.



De acordo com o treinamento da língua eletrônica, as amostras com a intensidade relativa maior à da matriz (à direita da matriz, acima de 7) devem conter leucina livre e indicam que houve redução no amargor dos peptídeos, já que a ação da exopeptidase de remover aminoácidos nas extremidades das cadeias polipeptídicas, inclusive os aminoácidos hidrofóbicos responsáveis pelo amargor, como a leucina, produz aminoácidos livres esses, por sua vez, são menos amargos nessa forma do que quando presentes na ligação peptídica (NOVOZYMES, LINDQVIST, 2010, SAHA; HAYASHI, 2001, MATOBA; HATA, 1972). Assim, a amostra 3211, que representa a amostra coletada na 5ª hora ao final do processo de



hidrólise com a enzima Flavourzyme<sup>®</sup>, 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 (311 a 3123 e 321) contêm pouco ou não contêm leucina na forma livre, dada a ação da enzima Alcalase<sup>®</sup>, 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). Isto quer dizer que, com o avanço do GH (3123>311) os resíduos de aminoácidos das cadeias peptídicas, inclusive os resíduos hidrofóbicos, estão mais expostos e por isso a língua eletrônica reconheceu maior semelhança entre a matriz e as amostras com o maior GH. Desta maneira, a proximidade destas amostras (à esquerda da matriz, abaixo de 7) em relação à matriz representa maior potencial amargor, já que, de acordo com a literatura, quanto mais pequenos e maior número de resíduos hidrofóbicos, como a leucina, nas posições laterais, mais amargos os peptídeos são (LINDQVIST, 2010, SPELLMAN; O'CUINN; FITZGERALD, 2009, SAHA; HAYASHI, 2001)

Estudo semelhante foi apresentado por Cheung et al., (2015), que avaliaram os efeitos do tratamento com exopeptidase no sabor de hidrolisados enzimáticos de IPS. Primeiramente, o IPS foi hidrolisado com uma endoprotease por 3 horas, e então tratado com aminopeptidase e carboxipeptidase por 1 e 7 horas. Na escala apresentada pelos autores, o hidrolisado resultante apenas da primeira etapa de hidrólise, com a endoprotease, apresentou intensidade de amargor igual a 4. Tanto o tratamento com a aminopeptidase ou carboxipeptidase na primeira hora apresentaram intensidade 3, ou seja, diminuiram apenas um ponto. Para a carboxipeptidase, o relato foi de sabor suave, enquanto para os dois tipos de aminopeptidases utilizadas a descrição foi de estranho e leitoso. Após 7 horas de hidrólise, o tratamento com a carboxipeptidase apresentou intensidade 1 para o amargor, o que significa que este reduziu consideravelmente, e com relatos de sabor suave, bom e complexo. Para os tratamentos com as aminopeptidases, a intensidade de amargor foi de 2, metade do substrato inicial, e os sabores relatados foram salgado, umami, aceitável, ácido e bom ou não bom. Tais resultados mostraram que a utilização de carboxipeptidase se mostrou mais eficiente na remoção do amargor e entrega de um produto final de sabor mais aceitável do que a utilização da aminopeptidase.

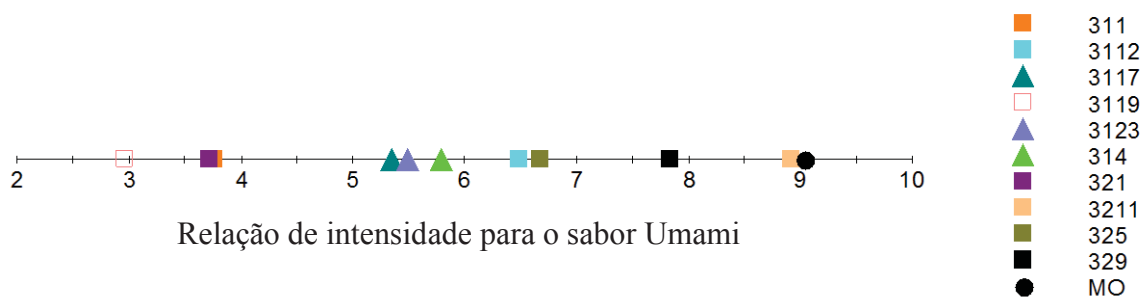
Spellman, O'cuinn e Fitzgerald (2009) propuseram que diferentes proteinases obtidas por *Bacillus* podem formar peptídeos mais ou menos amargos, e que a Alcalase 2.4L, mesma enzima utilizada na primeira parte do processo, apresenta atividade de glutamil-endopeptidase,

e que pode ser esta atividade a responsável pelo maior nível de amargor dos peptídeos gerados pela Alcalase® em comparação a outras enzimas do mesmo grupo.

A enzima usada na segunda etapa de hidrólise era uma aminoexopeptidase, e pode ser que caso uma carboxiexopeptidase fosse usada, a redução do amargor dos peptídeos gerados pela Alcalase® fosse ainda maior.

A Figura 32 mostra a intensidade do sabor umami para as amostras avaliadas, cujo atributo já era validado pelo fabricante do equipamento.

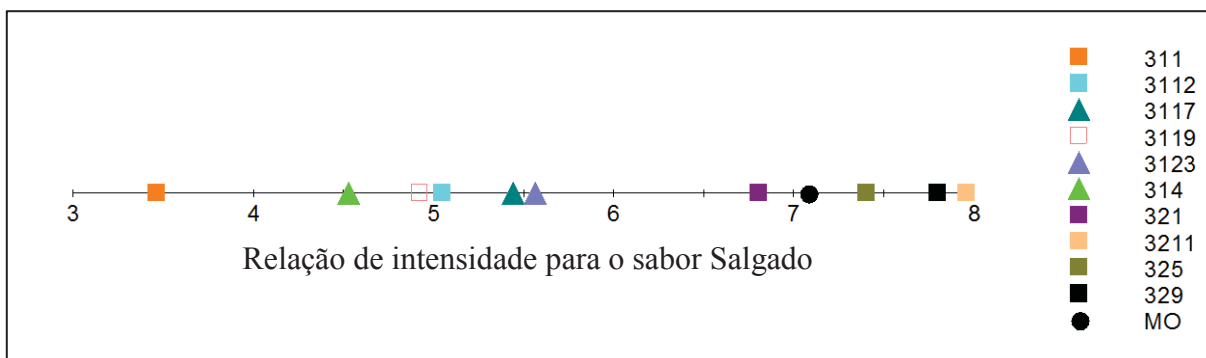
Figura 32. Intensidade relativa do sabor Umami das amostras obtidas no permeado do REM e na hidrólise do volume retido no REM.



As amostras resultantes da primeira parte do processo, especialmente, não mostraram uma tendência de comportamento. A amostra 3211, 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.

Tamura et al. (1990) *apud* Lindqvist (2010), baseados na proposição de que o amargor do peptídeo deriva da presença de grupos hidrofóbicos nas cadeias laterais hidrofóbicas e dos grupos na extremidade amino terminal, propuseram a redução do amargor de peptídeos bloqueando a extremidade amino terminal através de acetilação, e descobriram que aminoácidos amargos com a extremidade amino terminal bloqueada produziram sabor ácido, enquanto os sais de sódio dos mesmos aminoácidos modificados apresentaram sabor salgados ou umami. Neste sentido, é coerente que a amostra menos amarga, conforme explicação referente a Figura 31, é também a mais umami, como mostra a escala de intensidade da Figura 31, e a mais salgada, como mostra a escala de intensidade da Figura 33.

Figura 33. Intensidade do sabor salgado das amostras obtidas no permeado do REM e na hidrólise do volume retido no REM.



A amostra 311 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 al. (2015) 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. Os autores mostraram que o atributo umami, minimamente percebido nos hidrolisados de endopeptidase, foi significativamente maior nos hidrolisados tratados com exopeptidases, assim como o atributo salgado, cuja maior intensidade foi percebida na amostra tratada com aminopeptidase.

Ao mesmo tempo que a ação da exopeptidase na liberação de aminoácidos amargos contribui para o efeito de redução do amargor, a liberação de glutamina livre (Glu) pode estar associada com o aumento do sabor umami.

Vale destacar que, embora os resultados indiquem redução de amargor dos peptídeos gerados na segunda etapa do processo, nenhuma análise com painel humano foi conduzida, de modo que não se pode prever sobre a aceitabilidade dos peptídeos obtidos tanto na primeira quanto na segunda etapa. Por isso recomenda-se para trabalhos futuros que análises sensoriais sejam conduzidas em paralelo para conhecer o nível de aceitabilidade dos peptídeos antes e após a segunda etapa de hidrólise.

Foi possível perceber que a diferença na maneira de atuação das enzimas está relacionada à formação de peptídeos com diferentes perfis, tanto na distribuição molecular quanto na atividade biológica que exibem. Embora a massa molecular dos peptídeos é um dos parâmetros mais importantes para que estes possam apresentar atividade biológica, não é o único, pois caso fosse, a atividade antioxidante dos peptídeos seria maior quanto maior o grau de hidrólise, relação que se mostrou variável no decorrer dos processos.



## 5. CONCLUSÕES

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 escolha de uma concentração proteica menor e pressão de operação mais branda permitiu que o REM operasse com estabilidade, sem reduções bruscas no fluxo e com melhor aproveitamento da enzima. Também, a escolha da massa molecular de corte da membrana, de 5 kDa, se mostrou adequado pois os peptídeos recuperados tiveram massas moleculares menores do que 3,5 kDa, que era a faixa de interesse de acordo com as propriedades nutricionais que exibem. Previsivelmente, a formação de uma barreira secundária na superfície da membrana, resultado dos fenômenos de incrustação e formação de uma camada de gel, contribuiu para que peptídeos maiores não a permeassem.

O sistema proposto neste trabalho, composto por um reator enzimático de membrana operando em modo contínuo seguido por um reator em batelada para o processamento do volume retido no primeiro permitiu a recuperação de 100% da carga proteica alimentada, provando ser um sistema eficiente e sustentável.

Além da recuperação proteica, a combinação dos processos permitiu a obtenção de peptídeos com perfis diferentes; e mais especificamente, permitiu a obtenção de peptídeos com maior potencial antioxidante e melhor perfil sensorial: menos amargo e mais umami, características que são fundamentais para aplicações em alimentos.



## **SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Para trabalhos futuros sugere-se:

- Investigar os fenômenos de redução de fluxo em REM especificamente para membranas planas, pois há poucos trabalhos nesta área;
- Avaliar outros métodos para determinação de atividade antioxidante, como DPPH por exemplo, e avaliar a atividade antioxidante em diferentes sistemas alimentícios além do aquoso, como o sistema lipídico por exemplo;
- Avaliar o amargor dos peptídeos através de painel humano em paralelo com a avaliação na língua eletrônica;
- Isolar os peptídeos e identificar os seus aminoácidos;





## REFERÊNCIAS

ADLER-NISSEN, J. (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins (p. 427). London: Elsevier Applied Science Publishers Ltd.

AHMED, A. S.; EL-BASSIONY, T.; ELMALT, L. M.; IBRAHIM, H. R. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. **Food Research International**, v.74, p. 80-88, 2015.

AFONSO, W. O. **Obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico do soro de leite com elevado teor de di-tripeptídeos para utilização em nutrição clínica.** Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Official methods of analysis. 16 ed. Arlington: AOAC, 1995, v. 1.

BALDASSO, C. **Fracionamento dos componentes do soro de leite através da tecnologia de separação por membranas.** Tese (Doutorado em Engenharia), Departamento de Engenharia Química, Universidade federal do Rio Grande do Sul, 2011.

BARBOSA, O. A. **Proteínas do soro de queijo: hidrólise e formulação de suplemento alimentar para ratos Wistar.** Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2013.

BASSETTI, F. J. **Preparação, caracterização e aplicação de membranas poliméricas microporosas assimétricas.** Tese (Doutorado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

BORGES, P. Z. **Avaliação nutricional de concentrados proteicos obtidos do leite bovino.** Tese (Mestrado em Ciência da Nutrição), Universidade Estadual de Campinas, 2000.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. **Food Research International**, v. 73, p. 149-161, 2015.

BRIÃO, V. B.; TAVARES, C. R. G. Pore blocking mechanism for the recovery of milk solids from dairy wastewater by ultrafiltration. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 02, p. 393-407, 2012.

CARDOSO, G. S. P. **Avaliação físico-química e microbiológica do leite cru refrigerado e soro dos queijos minas frescal e mussarela estocados sob diferentes temperaturas.** Tese (Doutorado em Ciência Animal), Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, 2014.

CARLOS, M. R. V. **Avaliação das propriedades funcionais de hidrolisados de proteínas do soro de leite.** Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 1997.

CHEISON, S. C.; WANG, Z.; XU, S. Y. Hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor I. Characterisation of permeate flux and product recovery by multivariate data analysis. **Journal of Membrane Science**, v. 283, p. 45-56, 2006.

CHEISON, S. C.; WANG, Z.; XU, S. Y. Use of response surface methodology to optimise the hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 1134-114, 2007.

CHERYAN, M. Ultrafiltration and Microfiltration Handbook. Technomic Publishing Co., Lancaster, PA, 2<sup>a</sup> ed., 1998, p. 526.

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.

CHEUNG, L. K.Y.; ALUKO, R. E.; CLIFF, M. A.; LI-CHAN, E. C.Y. Effects of exopeptidase treatment on antihypertensive activity and taste attributes of enzymatic whey protein hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v. 13, p. 262-275, 2015.

CHOLLANGI, A.; HOSSAIN, M. M. Separation of proteins and lactose from dairy wastewater. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 398-404, 2007.

CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; FONTOURA, R.; MEIRA, S. M. M.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. **Peptides**, v. 61, p. 48-55, 2014.

FERREIRA, E. S. **Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos.** Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

GALVÃO, C. M. A. **Hidrólise Controlada de Proteínas do Soro Láctico Usando Tripsina e Quimotripsina Imobilizadas em Diferentes Suportes**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

GALVÃO, C. M. A.; PINTO, G. A.; JESUS, C. D.F.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L.C. Producing a phenylalanine-free pool of peptides after tailored enzymatic hydrolyses of cheese whey. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p. 109-117, 2009.

GUADIX, A.; CAMACHO, F.; GUADIX, E. M. Production of whey protein hydrolysates with reduced antigenicity in a stable membrane reactor. **Journal of Food Engineering**, v. 72, n. 4, 398-405, 2006.

GÉSAN-GUISIOU, G.; BOYAVAL, E.; DAUFIN, G. Critical stability condition in crossflow microfiltration of skimmed milk: transition to irreversible deposition. **Journal of Membrane Science**, v. 158, p. 211-222, 1999.

GIRARD, B.; FUKUMOTO, L. R. Membrane Processing of Fruit Juices and Beverages: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 91-157, 2000.

HABERT, A. C., BORGES, C.P., NÓBREGA, R. **Processos de separação por membranas**. Série Escola Piloto de Engenharia Química. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2006. 180p.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, n. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 163-169, 2007.

HOYLE, N., MERRITT, J. H. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 59, p. 76-79, 1994.

JIANG, S.; LIU, S.; ZHAO, C.; WU, C. Developing Protocols of Tricine-SDS-PAGE for Separation of Polypeptides in the Mass Range 1-30 kDa with Minigel Electrophoresis System. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 11, p. 640-649, 2016.

KELLY, S. T.; ZYDNEY, A. L. Protein fouling during microfiltration: Comparative behavior of different model proteins. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 55, p. 91-100, 1997.

KIM, H. O.; LI-CHAN, E. C. Quantitative structure-activity relationship study of bitter peptides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, p.10102–10111, 2006.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. I, p. 177-187, 2009.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 945-960, 2006.

LE MAUX, S.; NONGONIERMA, A. B.; BARRE, C.; FITZGERALD, R. J. Enzymatic generation of whey protein hydrolysates under pH-controlled and non pH-controlled conditions: Impact on physicochemical and bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 199, p. 246–251, 2016.

LEE, N.Y.; CHENG, J. T.; Enomoto, T.; Nakamura, I. The Antihypertensive Activity of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Peptide Containing in Bovine Lactoferrin. **Chinese Journal of Physiology**, n. 49, p. 67-73, 2006.

LINDQVIST, M. **Flavour improvement os water solutions comprising bitter amino acids**. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos), Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade de Sueca de Ciências Agrícolas, Uppsala, 2010.

LIU, C.; WU, X. Optimization of operation parameters in ultrafiltration process. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 195–202, 1998.

LIU, X.; JIANG, D.; PETERSON, D. G. Identification of Bitter Peptides in Whey Protein Hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 5719-5725, 2014.

MADUREIRA, A. R.; TAVARES, T.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 437-455, 2010.

MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. **Journal of food Science**, v. 55, n. 2, p. 381-385, 1990.

MATOBA, T; HATA, T. Relationship between bitterness of peptides and their chemical structures. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 36, p. 1423–1431, 1972.

MORENO, M. C. M.; CUADRADO, V. F. Enzymic Hydrolysis of vegetables proteins: mechanism and kinetics. **Process Biochemistry**, v. 28, p. 481-490, 1993.

NARAI-KANAYAMA, A.; SHIKATA, Y.; HOSONO, M.; ASO, K. High level production of bioactive di- and tri-tyrosine peptides by protease-catalyzed reactions. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 342-347, 2010.

NEWMAN, J.; HARBOURNE, N.; O'RIORDAN, D.; JACQUIER, J.C.; O'SULLIVAN, M. Comparison of a trained sensory panel and an electronic tongue in the assessment of bitter dairy protein hydrolysates. **Journal of Food Engineering**, v. 128, p. 127-131, 2014.

NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. The scientific evidence for the role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: A Review. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 640-656, 2015.

NOVOZYMES. Application sheet: enzymatic hydrolysis of proteins using Novozymes proteases. Novozymes Switzerland.

ÖNAY-UÇAR, E.; ARDA, N.; PEKMEZ, M.; YILMAZ, A. M.; BÖKE-SARIKAHYA, N.; KIRMIZIGÜL, S.; YALÇIN, A. S. Comparison of antioxidant capacity, protein profile and carbohydrate content of whey protein fractions. **Food Chemistry**, v. 150, p. 34-40, 2014.

PADILHA, R. Y. C. **Reator enzimático de membrana para proteólise de soro de queijo visando a produção de concentrado proteico com baixo teor de fenilalanina**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, 2007.

PARKIN, K. L., DAMODARAN, S., FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4<sup>a</sup> ed. Artmed, Porto Alegre, 2010, 900p.

PELLEGRINI, A.; DETTING, C.; THOMAS, U.; HUNZIKER, P. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine beta-lactoglobulin. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, n. 1526, p. 131-140, 2001.

PENG, X.; XIONG, Y. L.; KONG, B. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. **Food Chemistry**, v. 113, p. 196-201. 2009.

PESSATO, T. B.; CARVALHO, N. C.; TAVANOB, O. L.; FERNANDES, L. G.; ZOLLNER, R. L.; NETTO, F. M. Whey protein isolate hydrolysates obtained with free and immobilized Alcalase: Characterization and detection of residual allergens. **Food Research Internacional**, v. 83, p. 112-120, 2016.

PEREA, A.; UGALDE, U.; RODRIGUEZ, I.; SERRA, J.L. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: applications in industrial whey bioconversion processes. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 15, p. 418-423, 1993.

PEREA, A.; UGALDE, U. Continuous hydrolysis of whey proteins in a membrane recycle reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 18, p. 29-34, 1996.

PHELAN, M.; AHERNE, A.; FITZGERALD, R. J.; O'BRIEN, N. M. Casein-derived bioactive pep-tides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. **International Dairy Journal**, n. 11, v. 19, p. 643-54, 2009.

PINTO, G. A. **Biorefinaria de Soro de Queijo: engenharia de bioprocessos e sistemas aplicada à transformação de um resíduo poluente em produtos com valor agregado**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, 2008.

PRIETO, C. A.; GUADIX, A.; GONZÁLEZ-TELLO, P.; GUADIX, E. M. A cyclic batch membrane reactor for the hydrolysis of whey protein. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 257-265, 2007.

RAKSAKULTHAI, R.; HAARD, N. F. Exopeptidases and Their Application to Reduce Bitterness in Food: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 4, p. 401-445, 2003.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

RODEGHERI, C.; SENGER, E. L.; CAMERA, M. B. **Biorreator a membrana para a obtenção de um hidrolisado proteico de soro de leite**. Relatório (Projeto de Conclusão de Curso II), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2015.

SAHA, B. C., HAYASHI, K. Debittering of protein hydrolyzates. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 355-370, 2001.

SARMADIA, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, v. 31, p. 1949-1956, 2010.

SUJITH, P. A.; HYMAVATHI, T.V. Recent developments with debittering of protein hydrolysates. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, v. 4, p. 365-381, 2011.

SEGUENKA, B. **Fracionamento de soro de leite por processos de separação por membranas**. Qualificação (mestrado em ciência e tecnologia de alimentos), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2015.

SERPA, L. **Uso de membranas no tratamento do soro lácteo e seu aproveitamento para produção de poli-hidroxicarboxilatos (PHAs)**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SILVA, M. C.; SILVA, V. D. M.; LANA, A. M.; SILVESTRE, M. P. C. Grau de hidrólise e perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos obtidos a partir de concentrado proteico do soro de leite. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 3, p. 395-402, 2009.

SMITHERS, G. W. Whey-ing up the options – Yesterday, today and tomorrow. **International Dairy Journal**, v. 28, p. 2-14, 2015.

SPELLMAN, D.; O'CUINN, G; FITZGERALD, R.J. Bitterness in *Bacillus* proteinase hydrolysates of whey proteins. **Food Chemistry**, v. 114, p. 440-446, 2009.

SUJITH, P. A.; HYMAVATHI, T.V. Recent developments with debittering of protein hydrolysates. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, v. 4, p. 365-381, 2011.

STEINHAUER, T.; MARX, M.; BOGENDÖRFER, K.; KULOZIK, U. Membrane fouling during ultra and micro filtration of whey and whey proteins at different environmental conditions: The role of aggregated whey proteins as fouling initiators. **Journal of Membrane Science**, v.489, p. 20-27, 2015-a.

STEINHAUER, T.; HANÉLY, S.; BOGENDÖRFER, K.; KULOZIK, U. Temperature dependent membrane fouling during filtration of whey and whey proteins. **Journal of Membrane Science**, v.492, p. 364-370, 2015-b.

SCHWARTZBERG, H. G.; M. A. RAO. *Biotechnology and Food Process Engineering*. New York: Marcel Dekker, 1990.

TAVARES, T. G.; AMORIM, M.; GOMES, D.; PINTADO, M. E.; PEREIRA, C. D.; MALCATA, F. X. Manufacture of bioactive peptide-rich concentrates from Whey: Characterization of pilot process. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 547-552, 2012.

TORRES, D. P. M. **Gelificação térmica de hidrolisados enzimáticos de proteínas do soro de leite bovino: comportamento de sistemas aquosos mistos péptidos-polissacarídeos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia/Engenharia de Bioprocessos), Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, 2005.

VIOTTO, W. H. **Ultrafiltração de soro doce de queijo minas frescal: efeito de pré-tratamentos do soro no desempenho da membrana e na composição e solubilidade do concentrado proteico de soro**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. Geneva, World Health Organization, 2002 (WHO Technical Report Series, No. 935).

YADAV, J.S.S.; YAN, S.; PILLI, S.; KUMAR, L.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 756-774, 2015.

ZHANG, Q.; WU, H.; LING, Y.; LU, R. Isolation and identification of antioxidant peptides derived from whey protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and Q-TOF MS. **Journal of Dairy Research**, v. 80, p. 367-373, 2013.



## **APÊNDICE A: PROCEDIMENTO DE LIMPEZA DA MEMBRANA.**

A limpeza foi conduzida conforme os passos apresentados abaixo. Após o reestabelecimento do pH depois de cada etapa de limpeza o fluxo de permeado com água foi medido para verificar a eficiência da limpeza, devendo atingir no mínimo 95 % do valor inicial.

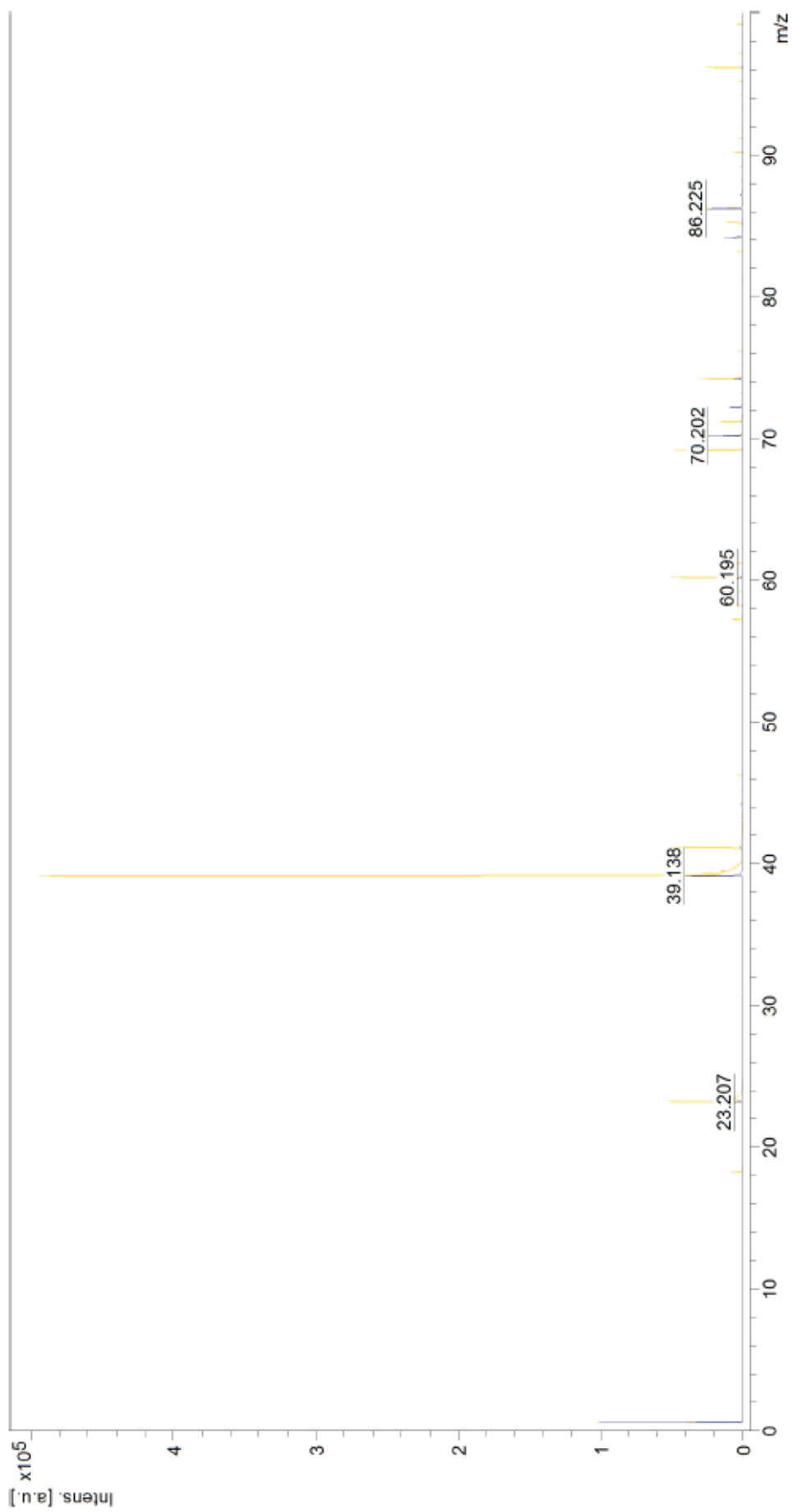
1. Enxágue com água destilada, descartando-se permeado e rejeito, para eliminação dos sólidos do sistema;
2. Enxágue com água destilada com recirculação por 30 minutos;
3. Limpeza alcalina: pH ajustado entre 10,0 e 10,5 com solução de hidróxido de sódio 1,0 N, com recirculação de permeado e rejeito aquecido entre 40 e 50 °C por 30 minutos;
4. Limpeza cloro-alcalina: pH ajustado entre 10,0 e 10,5 com solução de hidróxido de sódio 1,0 N, adição de 200 ppm de hipoclorito de sódio, com recirculação de permeado e rejeito aquecido entre 40 e 50 °C por 30 minutos;

OBS: a limpeza alcalina e cloro alcalina procedeu-se com adição de detergente não-iônico (Ultrakleen II) na concentração de 0,1% do volume da solução, nos casos necessários.

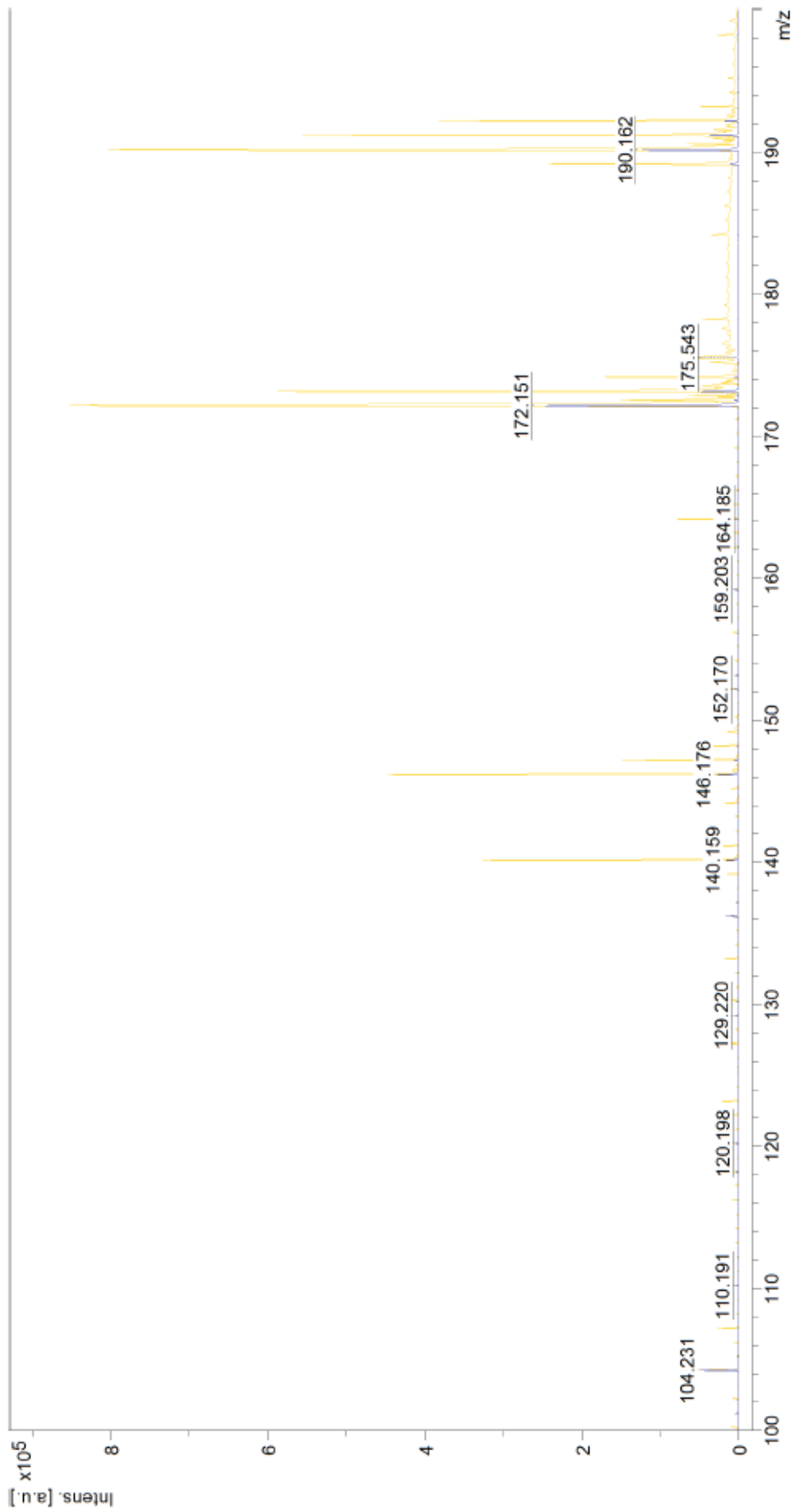
5. Enxágue conforme o primeiro passo, até atingir pH neutro;
6. Limpeza ácida: pH ajustado entre 1,8 e 2,0 com solução de ácido nítrico, com recirculação de permeado e rejeito aquecido entre 40 e 50 °C por 30 minutos;
7. Enxágue conforme o primeiro passo, até atingir pH neutro;
8. Limpeza alcalina com adição de enzima em concentração de 0,5% do volume da solução, com recirculação de permeado e rejeito por 30 minutos a 42 °C;
9. Enxágue conforme o primeiro passo, até atingir pH neutro;

**APÊNDICE B: ESPECTROS COM PERFIL M/Z DAS AMOSTRAS DE HIDROLISADO PERMEADO.**

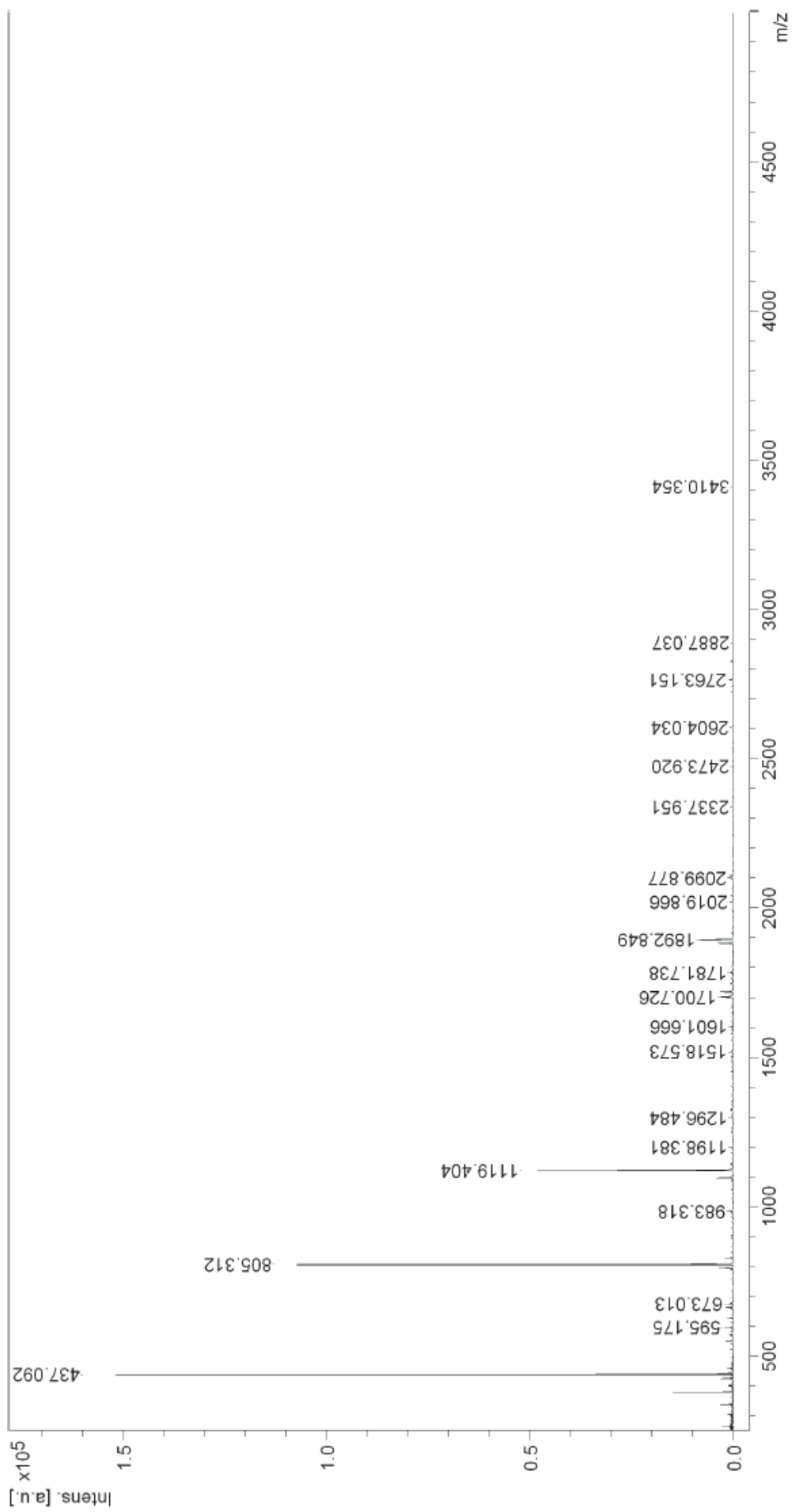
- 1) Amostra 1; tempo: 0,25 h; GH: 11,90%; padrão 0 a 100 Da.



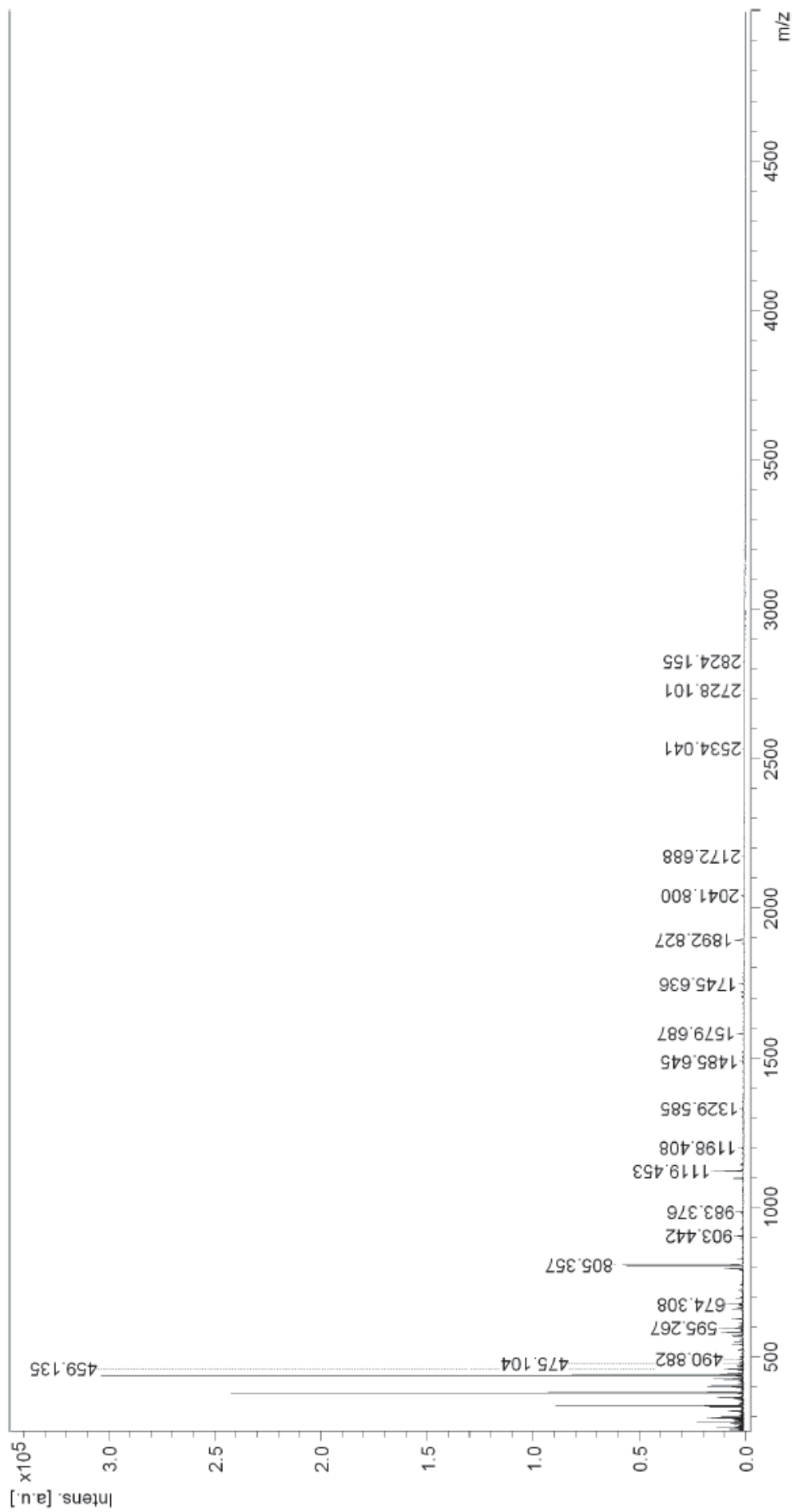
2) Amostra 1; tempo: 0,25 h; GH: 11,90%; padrão 100 a 200 Da.



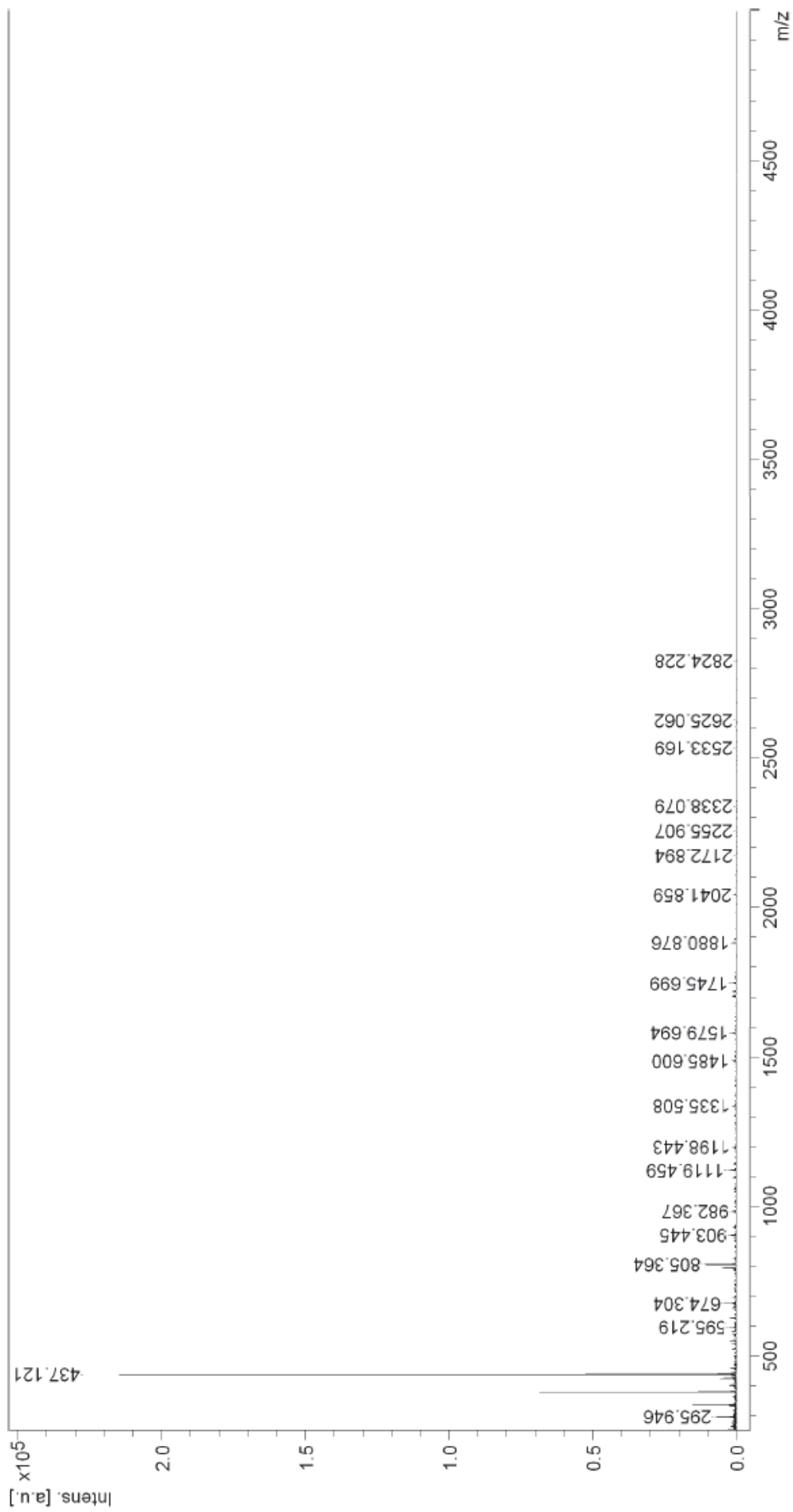
3) Amostra 1; tempo: 0,25 h; GH: 11,90%; padrão 500 a 5000 Da.



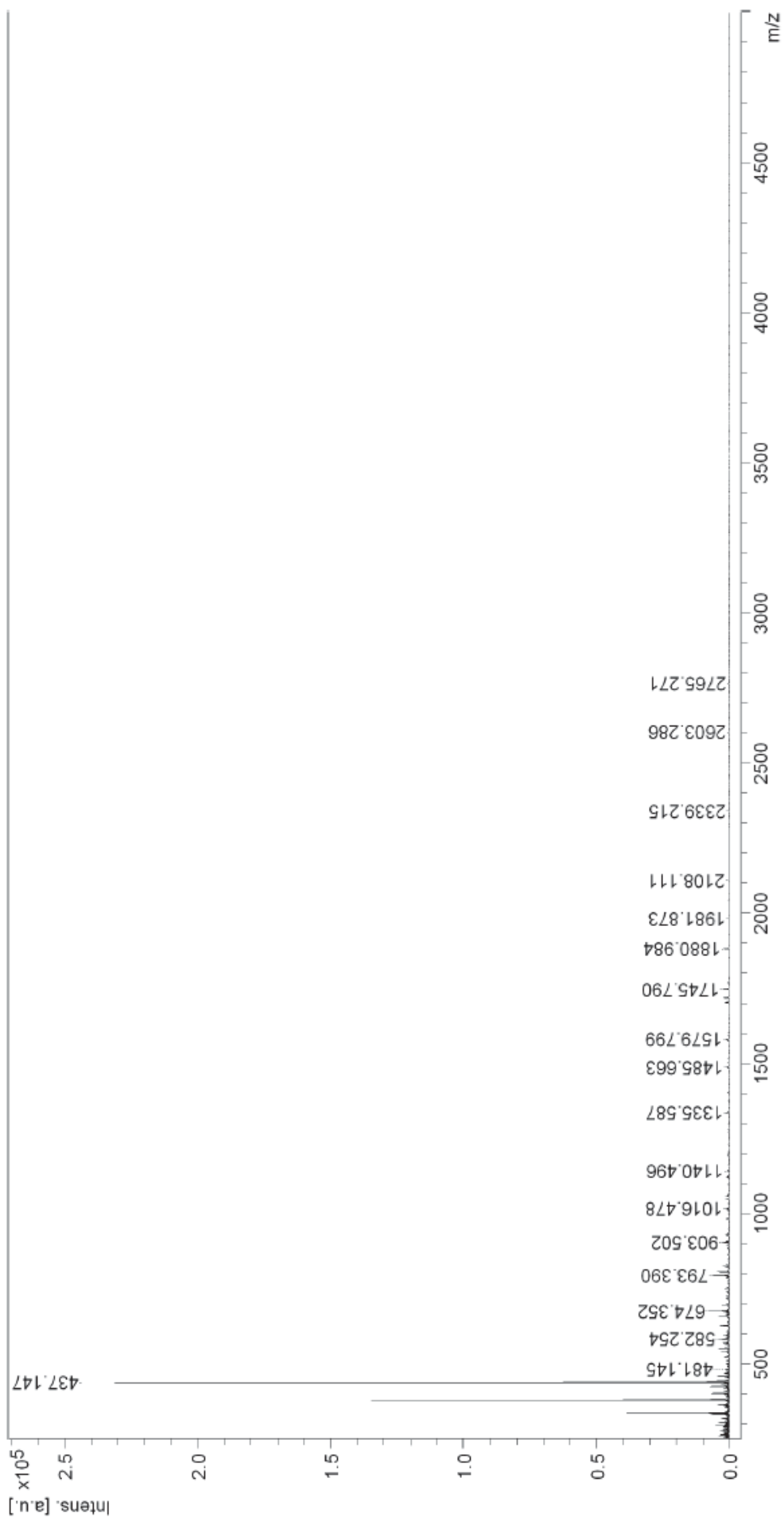
4) Amostra 2; tempo: 0,5h; GH: 13,50%; padrão 500 a 5000 Da.



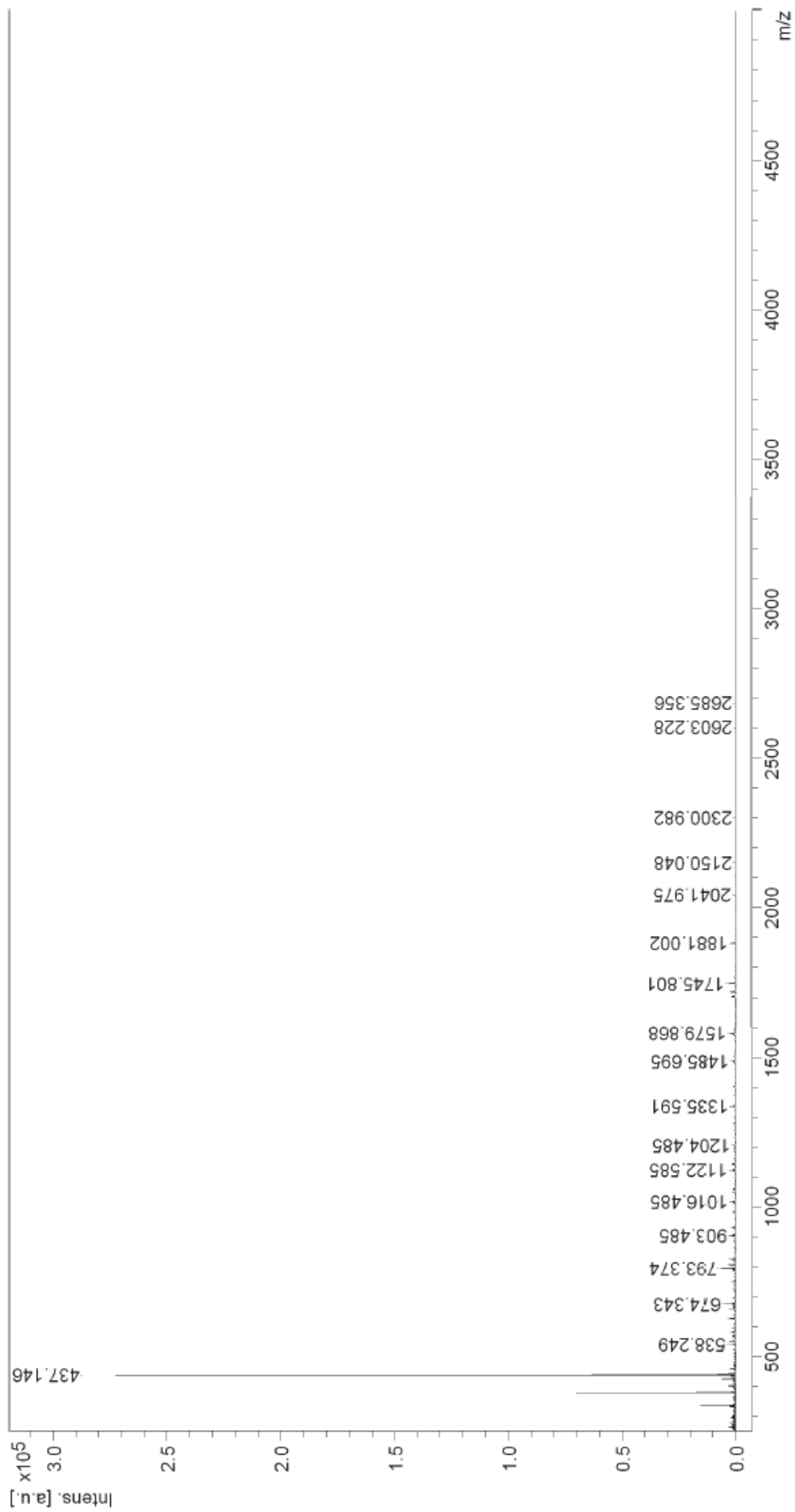
5) Amostra 4; tempo: 1 h; GH: 15,30%; padrão 500 a 5000 Da.



6) Amostra 6; tempo: 2 h; GH: 17,31%; padrão 500 a 5000 Da.

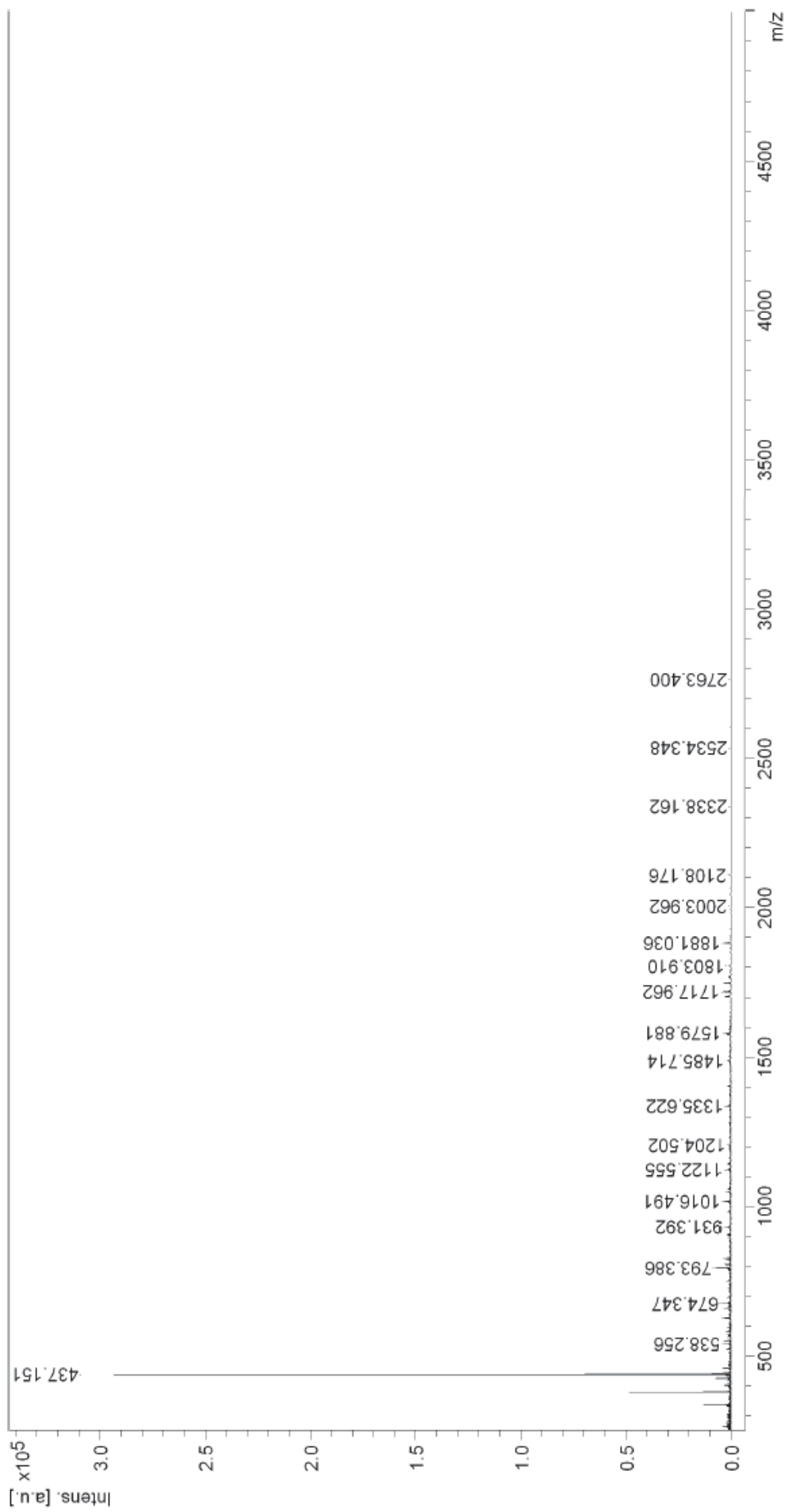


7) Amostra 7; tempo: 2,5 h; GH: 17,88%; padrão 500 a 5000 Da.

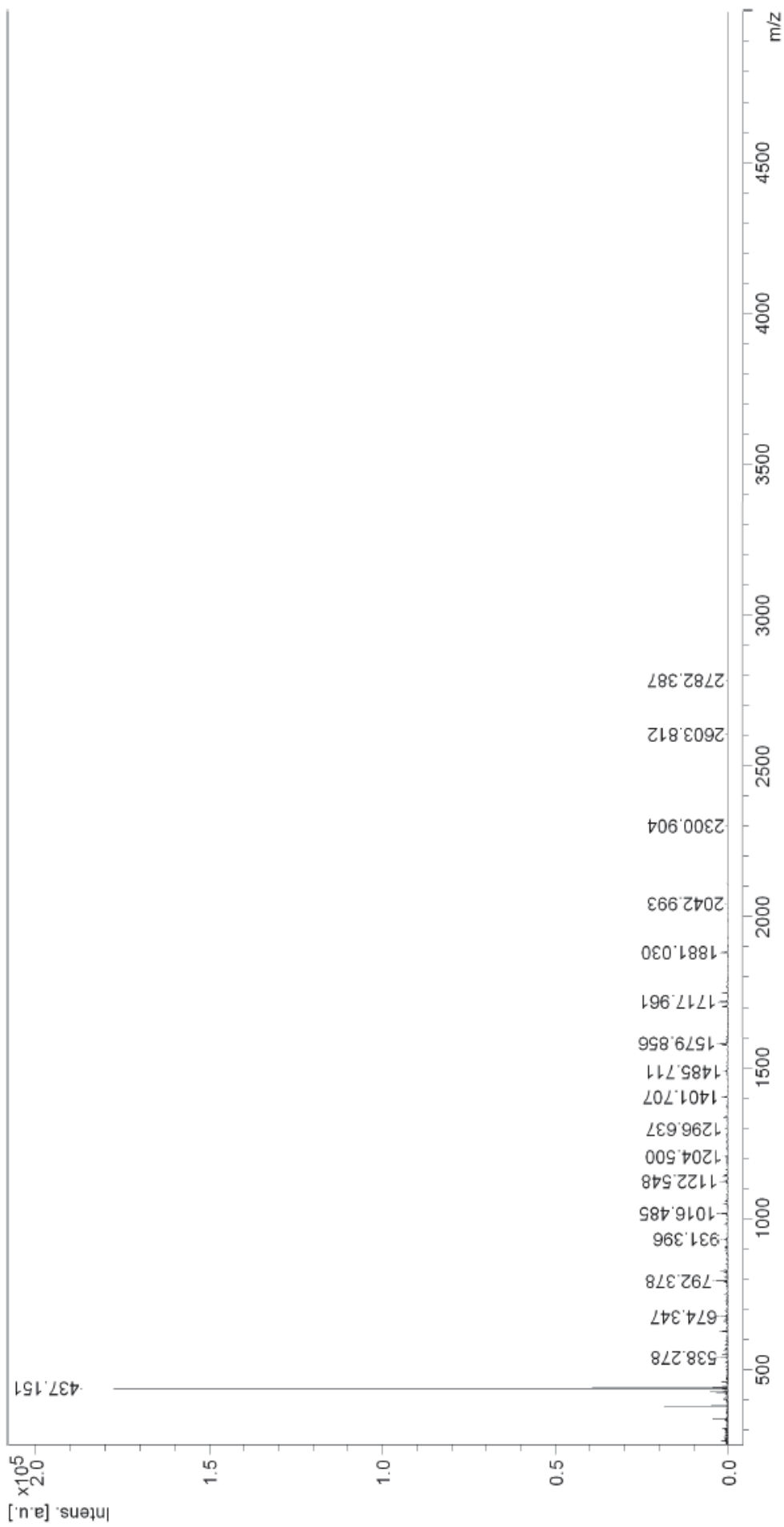




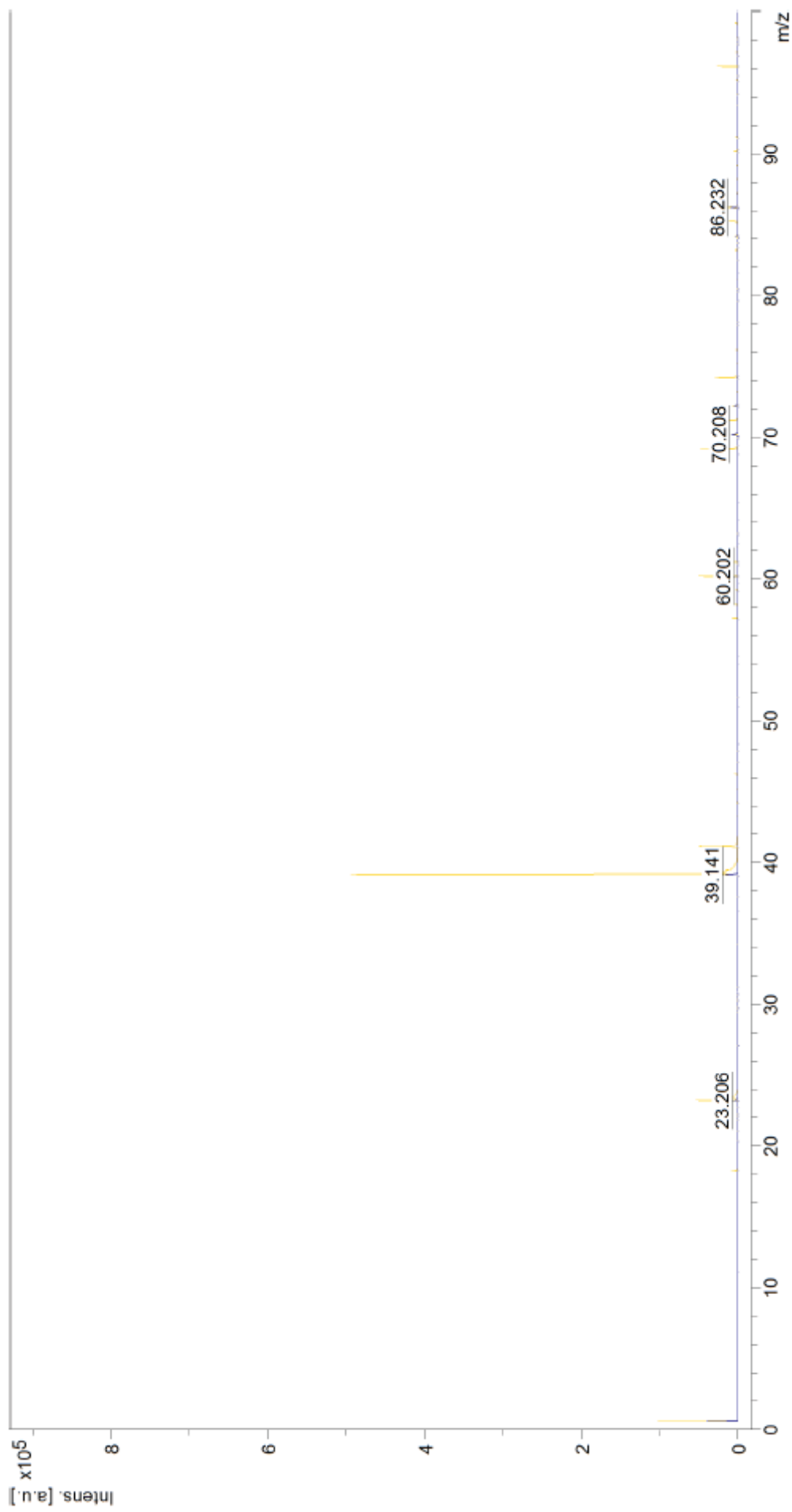
8) Amostra 8; tempo: 3 h; GH: 18,52%, padrão 500 a 5000 Da.



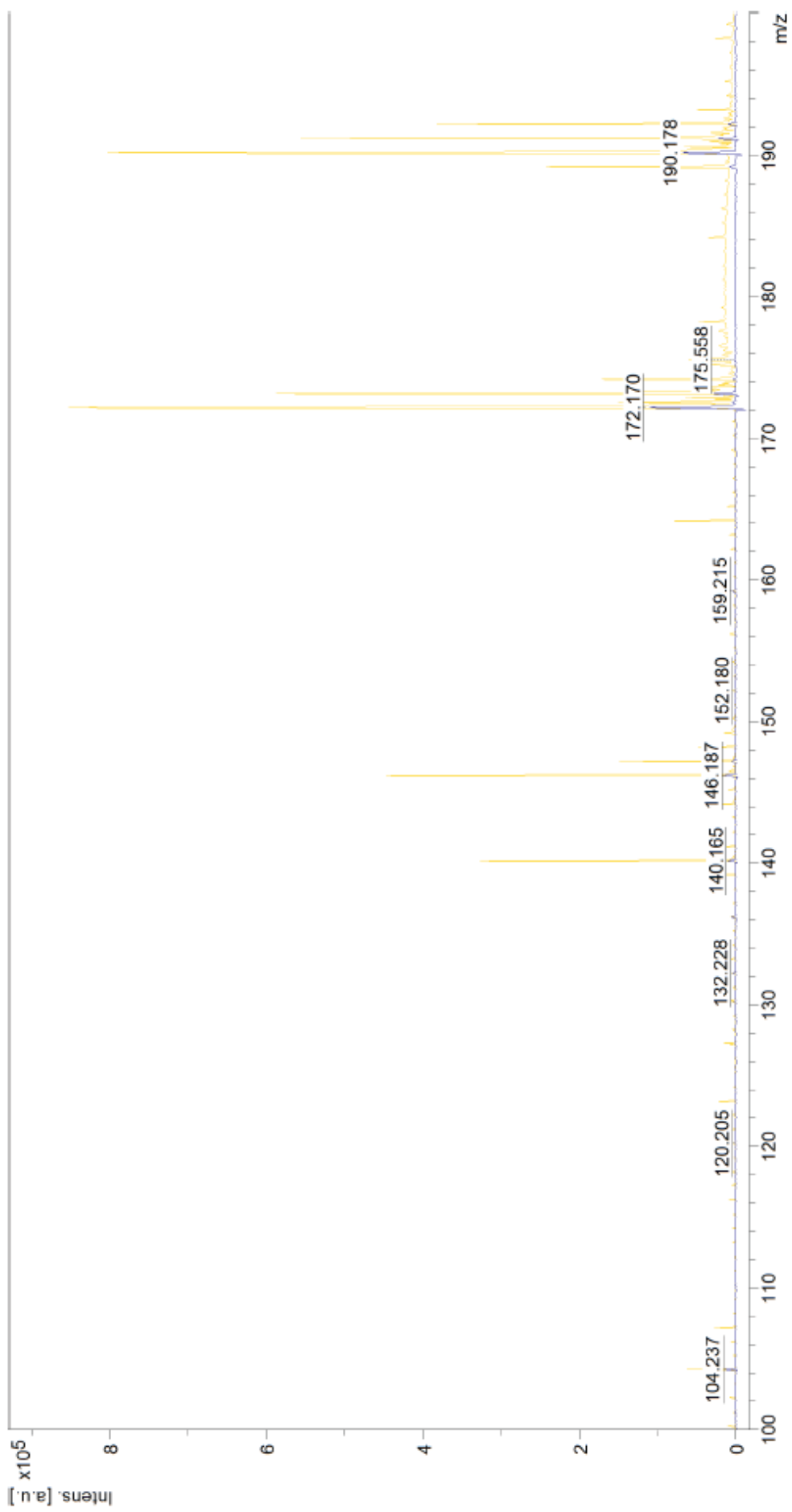
9) Amostra 10; tempo: 4h; GH: 19,59%; padrão 500 a 5000 Da.



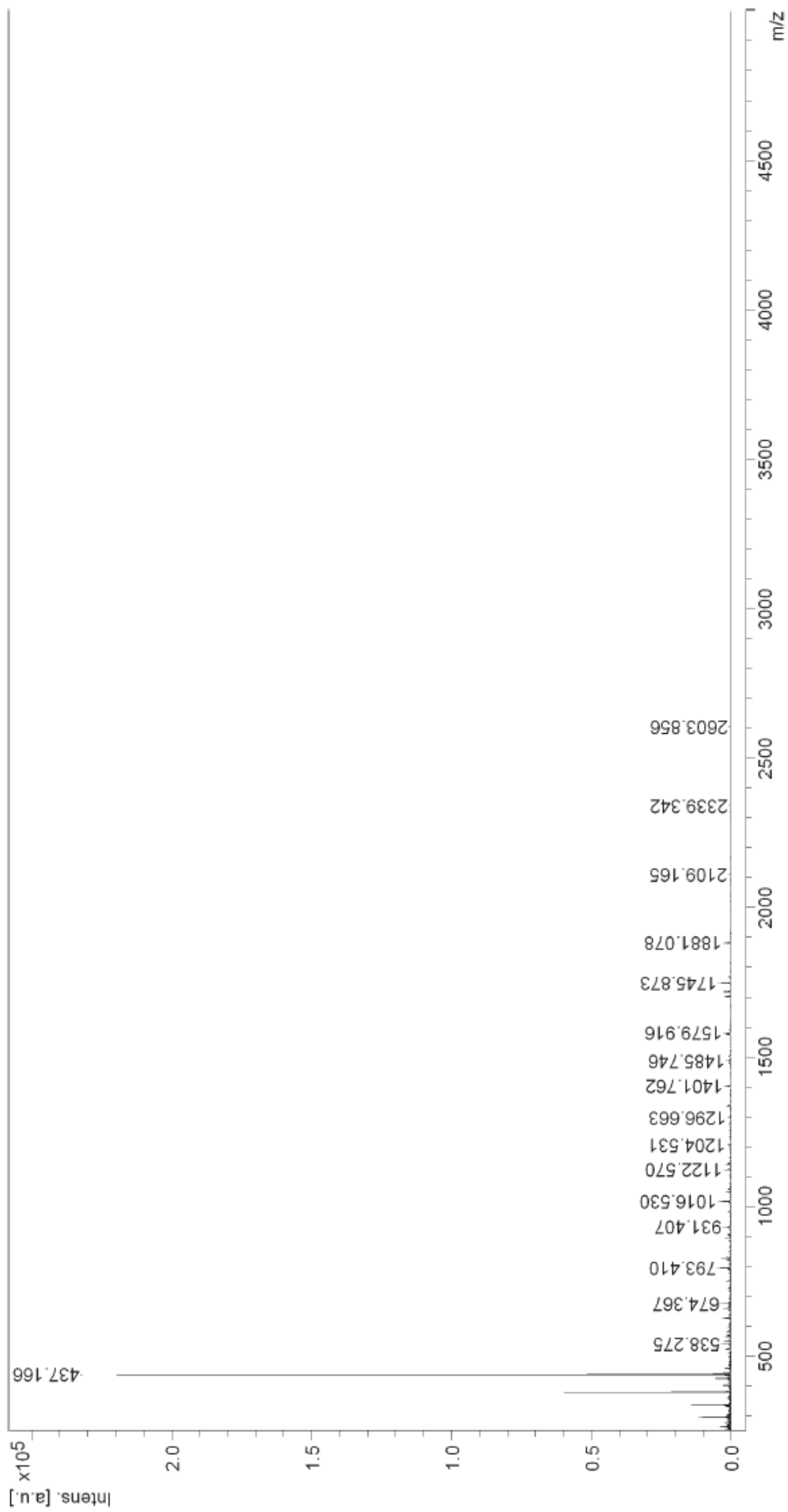
10) Amostra 13; tempo: 6h; GH: 20,66%, padrão 0 a 100 Da.



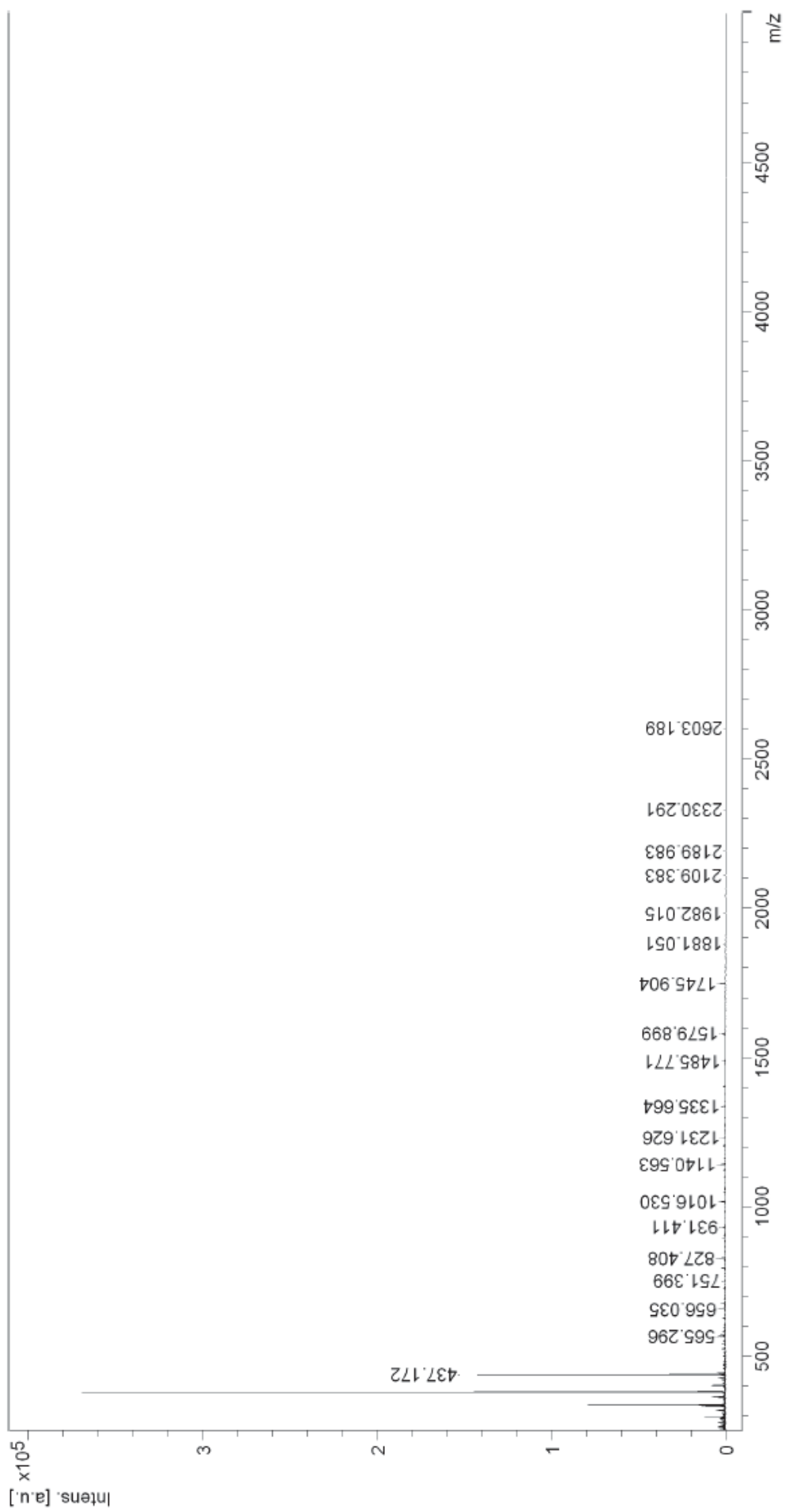
11) Amostra 13; tempo: 6 h; GH: 20,66%, padrão 100 a 200 Da.



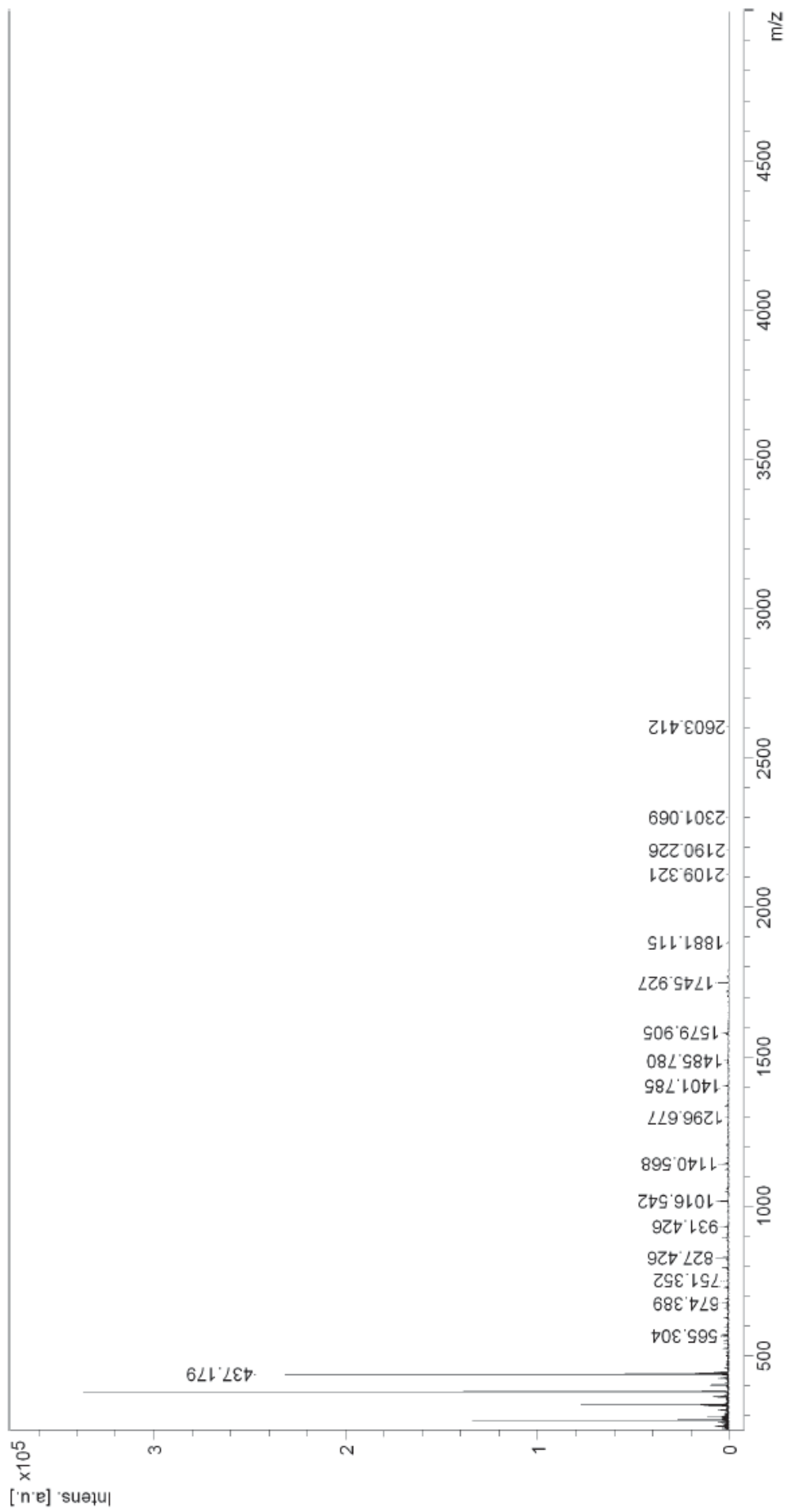
12) Amostra 13; tempo: 6h; GH: 20,66%; padrão 500 a 5000 Da.



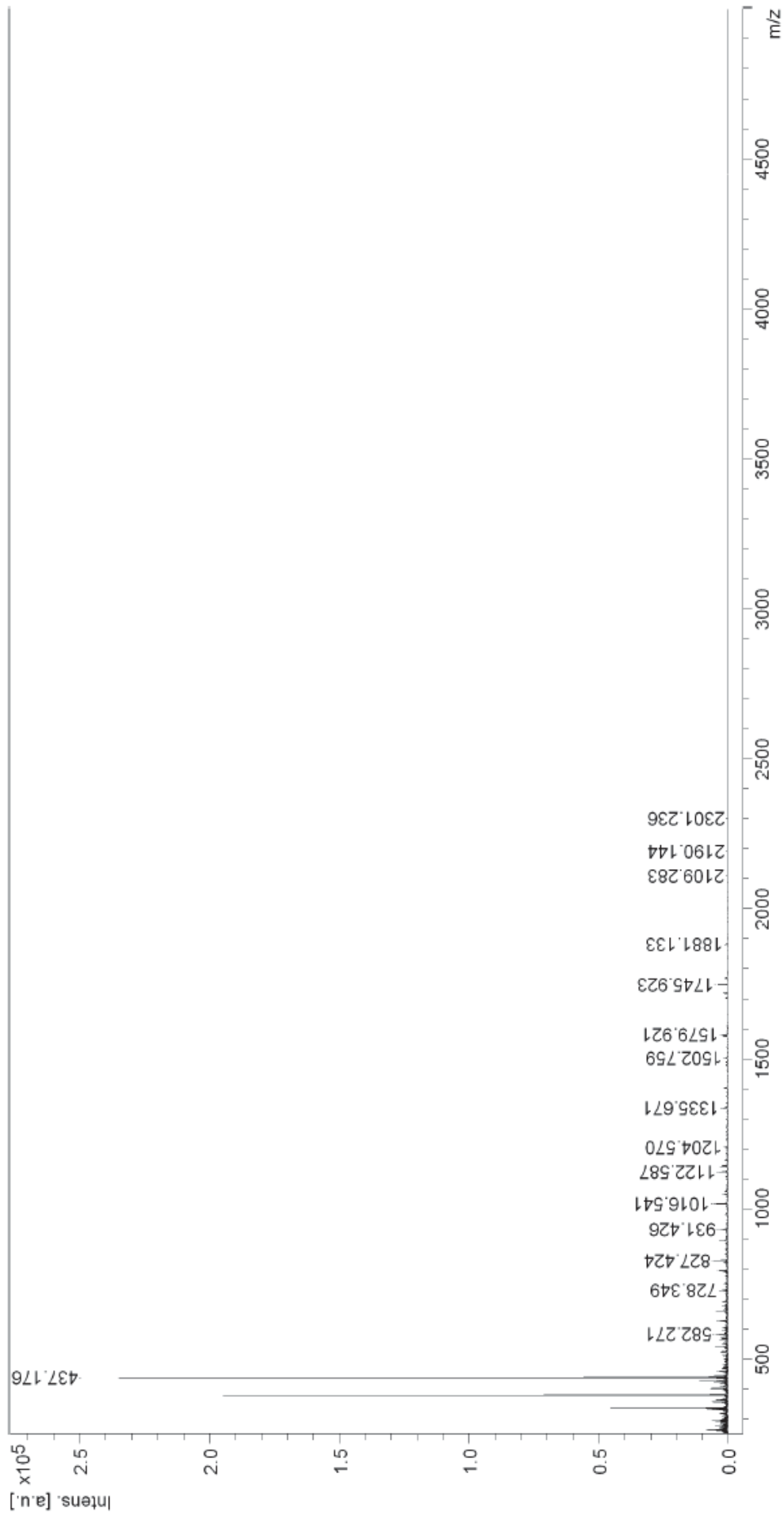
13) Amostra 15; tempo: 8h; GH: 21,54%; padrão 500 a 5000 Da.



14) Amostra 19; tempo: 12 h; GH: 22,32%; padrão 500 a 5000 Da.

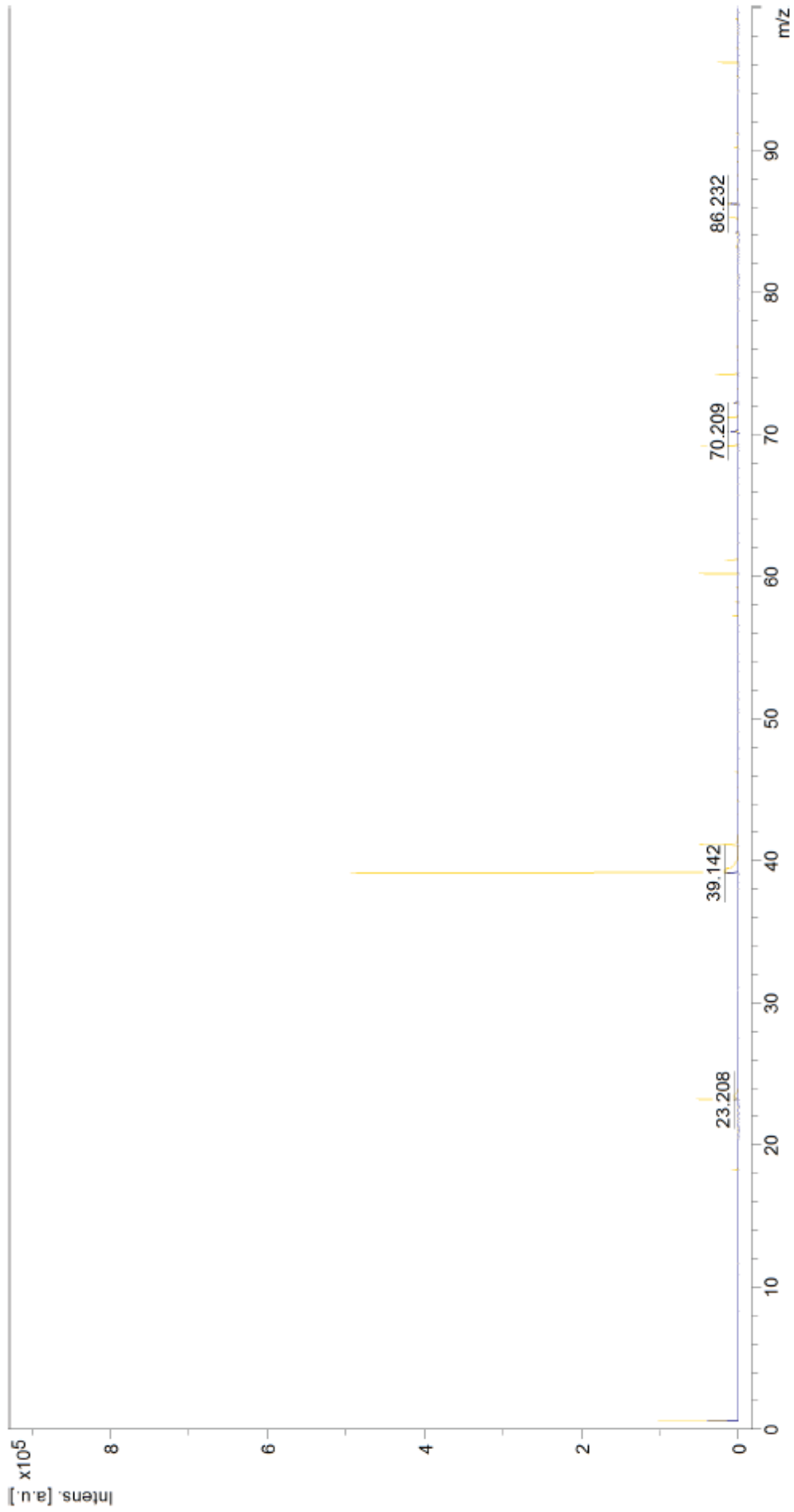


15) Amostra 21; tempo: 13 h; GH: 22,52%; padrão 500 a 5000 Da.

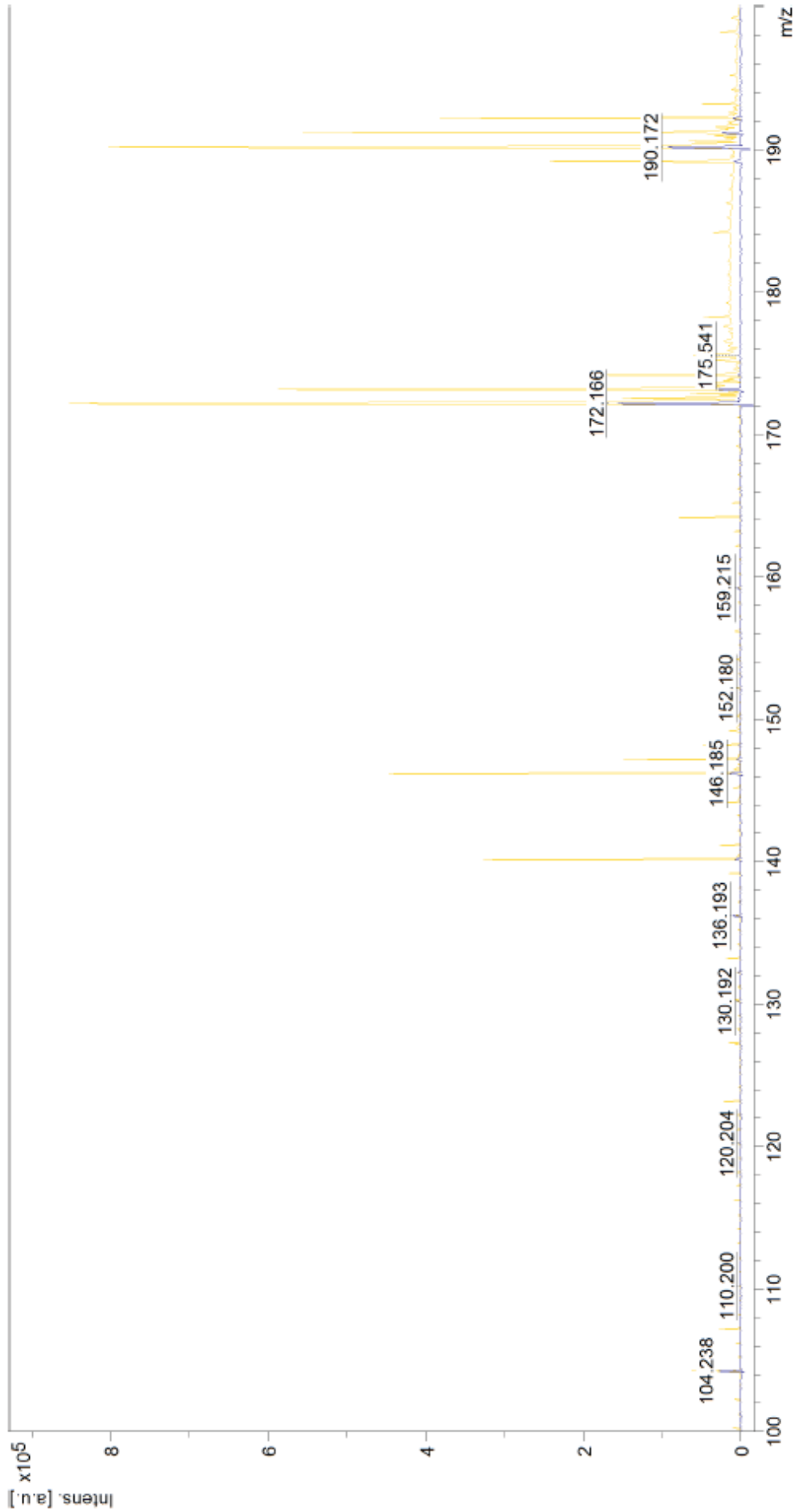




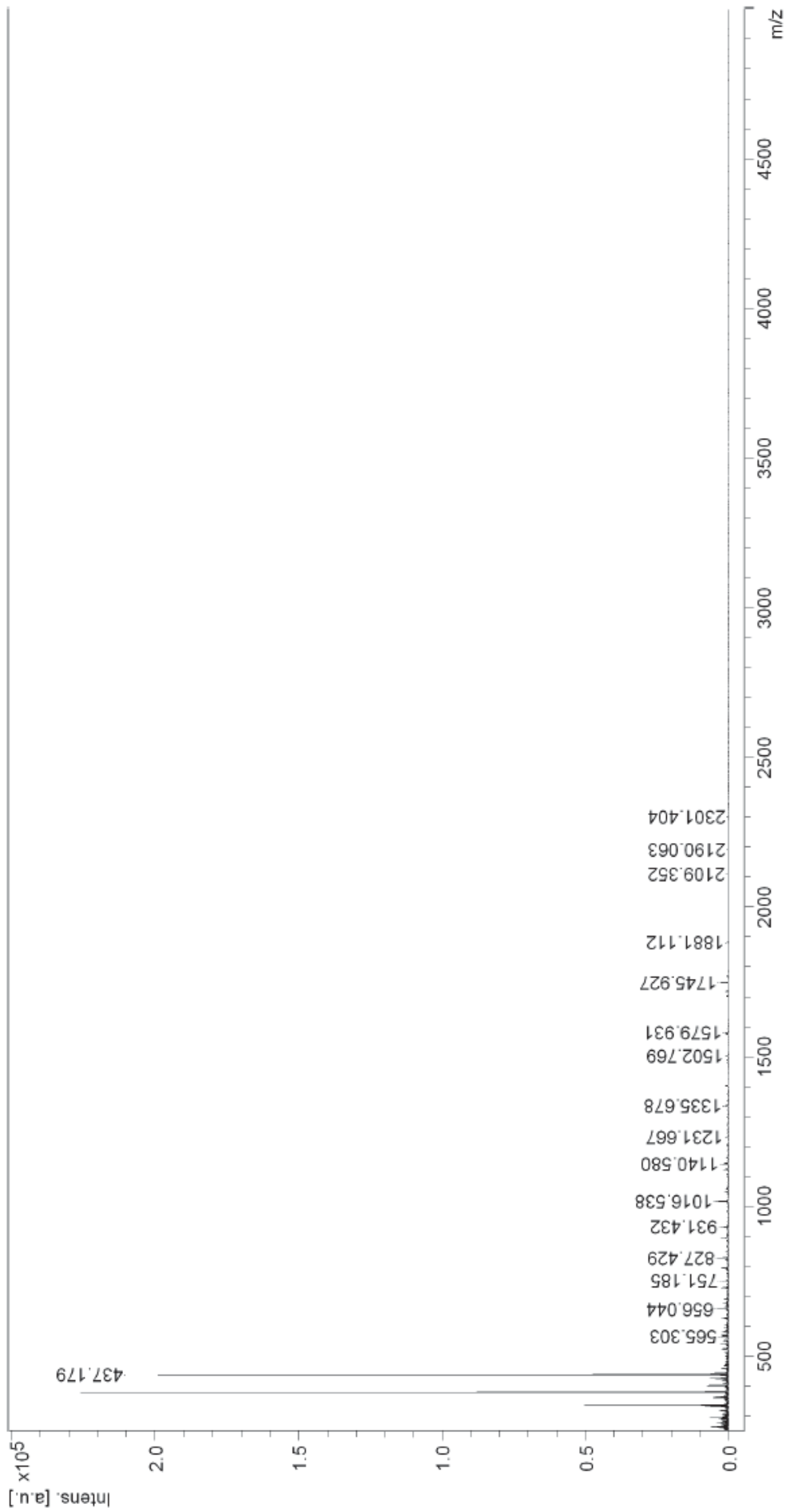
16) Amostra 23; tempo: 14h; GH: 22,81%; padrão 0 a 100 Da.



17) Amostra 23; tempo: 14h; GH: 22,81%; padrão 100 a 200 Da.



18) Amostra 23; tempo: 14h; GH: 22,81%; padrão 500 a 5000 Da.



**APÊNDICE C. DISTRIBUIÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES DOS PEPTÍDEOS RECUPERADOS NO PERMEADO DO REM.**

	Amostra												
	1	2	4	6	7	8	10	13	15	19	21	23	
Tempo (h)	0,25	0,5	1	2	2,5	3	4	6	8	12	13	14	
GH (%)	11,90	13,50	15,30	17,31	17,88	18,52	19,59	20,66	21,54	22,32	22,52	22,81	
Perfil m/z dos peptídeos (Da)	437,092	437,114	295,946	437,147	437,146	437,151	437,151	437,166	437,172	437,179	437,176	437,179	
	459,064	459,135	437,121	459,153	447,126	459,138	459,140	459,154	538,265	499,170	459,161	459,170	
	569,123	460,891	459,107	481,145	459,136	468,139	469,143	469,152	565,296	513,204	469,150	513,201	
	582,154	469,125	538,212	538,259	513,159	482,080	500,205	513,183	569,253	538,265	513,190	538,284	
	595,175	475,104	582,197	560,253	538,249	513,165	513,175	538,275	582,245	565,304	538,285	560,265	
	655,915	490,882	595,219	565,289	565,283	538,256	538,278	565,293	594,271	582,260	565,300	565,303	
	662,241	538,247	625,227	582,254	582,226	565,285	565,289	582,247	625,285	594,225	575,259	575,270	
	663,243	550,287	626,247	587,203	587,166	582,225	582,241	594,246	656,035	625,299	582,271	582,271	
	673,013	582,227	655,974	595,275	595,244	595,265	625,269	625,291	674,384	674,389	594,276	625,301	
	788,257	595,267	665,266	625,281	625,269	625,267	656,020	652,299	690,329	690,335	603,210	656,044	
	792,273	625,242	674,304	656,013	656,013	656,013	674,347	656,027	728,358	728,358	625,305	674,393	
	805,312	626,238	678,299	674,352	674,343	674,347	680,301	674,367	751,399	751,352	656,049	690,337	
	827,264	628,318	696,282	696,369	696,333	696,331	696,336	690,315	792,401	788,395	674,391	724,358	
	978,331	655,978	724,261	751,335	751,321	751,324	751,322	751,347	793,412	792,403	690,337	728,368	
	983,318	674,308	751,278	769,775	786,329	788,360	774,370	788,395	817,395	793,431	728,349	751,185	
	1096,385	696,334	769,877	786,343	788,361	792,386	786,350	792,411	821,408	821,414	751,366	792,416	
	1119,404	788,301	788,309	788,362	792,372	793,386	788,362	793,410	827,408	827,426	788,410	793,426	
	1141,358	792,318	792,318	792,378	792,378	793,374	805,400	792,378	805,425	931,411	847,457	792,416	827,429
	1181,181	793,338	793,329	793,390	793,390	805,396	821,369	793,378	817,381	939,422	931,426	793,423	862,445
	1198,381	794,306	794,287	805,421	805,421	821,366	827,384	794,324	821,403	982,447	939,422	827,424	867,436
1249,446	805,357	805,364	817,371	827,366	827,366	931,392	805,398	827,409	1012,474	982,480	931,426	931,432	
1296,484	827,361	827,319	821,380	827,380	867,386	982,444	821,377	847,254	1016,530	1012,476	982,484	982,476	
1322,496	903,442	884,319	827,382	827,382	896,424	1012,421	827,380	931,407	1047,522	1016,542	1016,541	1016,538	
1351,426	925,503	903,445	895,408	895,408	903,485	1016,491	884,366	982,457	1100,539	1047,546	1047,551	1047,547	

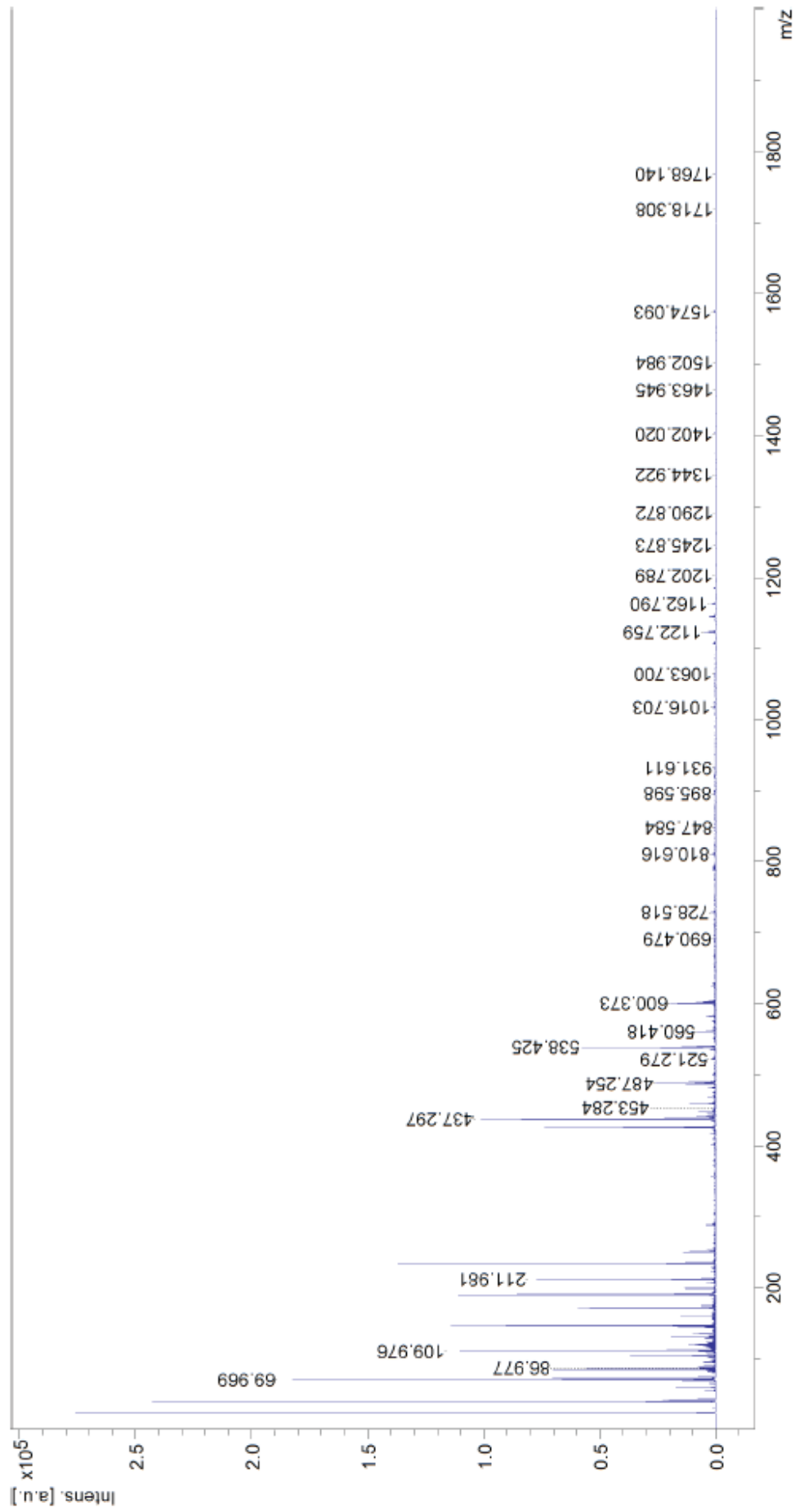
Perfil m/z dos peptídeos (Da)		908,397		1047,499		931,396		1012,444		1122,529		1100,554		1055,606		1100,562	
1451,502	978,389	908,345	903,502	908,397	1047,499	931,396	1012,444	1122,529	1100,554	1055,606	1100,562						
1464,505	983,376	931,315	982,427	925,450	1055,562	982,442	1016,530	1140,563	1106,581	1100,565	1108,557						
1494,555	1096,439	982,367	1012,425	931,359	1108,550	1012,435	1047,522	1144,571	1122,546	1106,597	1122,571						
1502,545	1119,453	983,394	1016,478	982,427	1119,552	1016,485	1055,598	1162,546	1140,568	1108,537	1140,580						
1518,573	1122,446	1012,347	1047,476	1012,408	1122,555	1047,479	1122,570	1204,542	1144,581	1122,587	1144,595						
1579,642	1140,416	1016,388	1119,552	1016,485	1140,533	1055,571	1140,575	1231,626	1151,621	1140,586	1162,586						
1601,666	1144,459	1047,403	1122,526	1047,481	1144,553	1119,520	1144,561	1296,657	1162,548	1144,608	1204,558						
1700,726	1181,386	1096,443	1140,496	1059,465	1162,565	1122,548	1162,585	1335,664	1204,551	1162,596	1231,667						
1717,767	1193,479	1119,459	1144,524	1108,532	1186,583	1140,532	1204,531	1401,760	1231,653	1204,570	1245,663						
1745,623	1198,408	1122,438	1162,532	1119,519	1193,753	1144,561	1231,623	1477,759	1245,672	1231,658	1296,689						
1760,695	1303,544	1126,430	1193,573	1122,585	1198,540	1162,566	1245,640	1480,717	1296,677	1245,668	1321,603						
1781,738	1329,585	1140,423	1198,498	1140,518	1204,502	1184,603	1256,654	1485,771	1335,668	1256,674	1335,678						
1788,694	1351,614	1144,435	1204,483	1144,582	1231,604	1186,586	1279,587	1502,746	1351,554	1296,684	1351,661						
1880,808	1431,606	1193,482	1279,557	1162,579	1279,580	1204,500	1296,663	1573,839	1372,689	1321,627	1372,477						
1892,849	1485,645	1198,443	1335,587	1186,483	1296,640	1231,589	1335,647	1579,899	1401,785	1335,671	1401,789						
1914,815	1502,589	1279,469	1401,670	1193,663	1335,622	1279,581	1344,684	1590,822	1480,724	1351,714	1474,780						
2019,866	1518,596	1303,561	1485,663	1198,496	1372,671	1296,637	1401,762	1608,816	1485,780	1373,690	1477,763						
2041,796	1579,687	1335,508	1502,691	1204,485	1401,727	1335,631	1477,365	1702,953	1502,768	1401,798	1488,837						
2064,786	1601,630	1401,574	1516,735	1231,588	1485,714	1401,707	1480,715	1717,980	1573,857	1472,798	1502,769						
2099,877	1619,658	1485,600	1519,676	1279,557	1488,762	1477,677	1485,746	1745,904	1579,905	1474,772	1573,877						
2106,965	1677,775	1488,597	1573,693	1296,608	1502,711	1485,711	1488,803	1761,901	1590,837	1485,780	1579,931						
2172,810	1700,764	1516,664	1579,799	1335,591	1516,792	1488,842	1502,721	1767,889	1608,810	1488,812	1589,836						
2337,951	1702,709	1518,629	1590,739	1401,708	1573,810	1502,691	1537,899	1881,051	1700,992	1502,759	1601,860						
2473,920	1717,749	1579,694	1601,773	1485,695	1579,881	1573,808	1573,845	1982,015	1718,028	1537,736	1608,829						
2532,988	1745,636	1619,705	1619,668	1488,718	1590,782	1579,856	1579,916	2037,916	1745,927	1573,883	1701,015						
2604,034	1760,695	1701,776	1700,874	1502,679	1601,836	1590,774	1590,823	2109,383	1761,901	1579,921	1718,049						
2722,042	1767,646	1703,754	1702,856	1518,690	1700,926	1601,847	1601,855	2189,983	1767,912	1589,767	1745,927						
2740,074	1880,820	1717,807	1717,912	1573,864	1702,949	1700,929	1700,971	2301,111	1881,115	1608,833	1761,928						
2763,151	1892,827	1745,699	1745,790	1579,868	1717,962	1702,888	1718,010	2321,047	2038,074	1701,008	1767,924						
2779,401	1906,780	1761,729	1767,825	1590,751	1745,827	1717,961	1745,873	2330,291	2042,245	1718,051	1783,937						
2824,227	1926,765	1767,702	1880,984	1601,854	1767,844	1745,819	1767,877	2375,127	2109,321	1745,923	1789,892						
2870,068	2037,863	1880,876	1926,917	1700,890	1789,816	1767,819	1881,078	2603,189	2190,226	1761,919	1881,112						
2887,037	2041,800	1892,866	1981,873	1702,894	1803,910	1881,030	2042,002	-	2301,069	1767,917	2109,352						
3410,354	2060,948	1926,803	1993,976	1717,920	1881,036	1926,726	2109,165	-	2603,412	1783,930	2190,063						
Perfil m/z dos peptídeos																	

Perfil m/z dos peptídeos

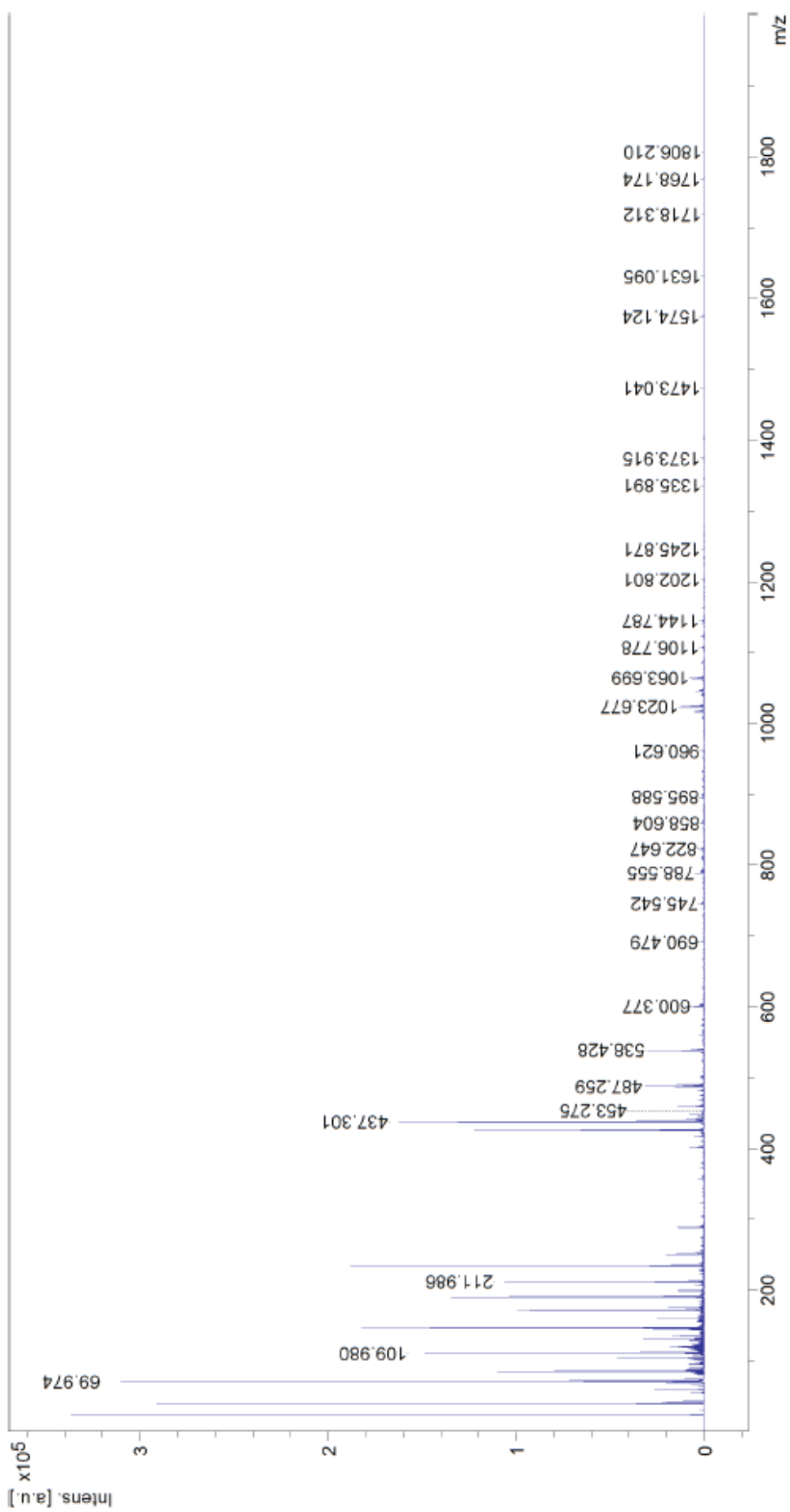
3428,389	2099,835	1981,640	2041,903	1745,801	1893,944	1982,959	2150,048	-	-	1789,904	2301,404
-	2108,921	2041,859	2045,895	1767,814	1904,118	1994,007	2300,986	-	-	1881,133	-
-	2172,688	2063,867	2063,955	1803,920	1926,994	2042,993	2339,342	-	-	2109,283	-
-	2534,041	2108,015	2108,111	1881,002	1981,944	2063,916	2603,856	-	-	2190,144	-
-	2603,198	2172,894	2339,215	1893,027	1994,051	2108,160	-	-	-	2301,236	-
-	2728,101	2255,907	2533,120	1926,879	2003,962	2300,904	-	-	-	-	-
-	2764,354	2338,079	2603,286	1982,881	2042,008	2603,812	-	-	-	-	-
-	2824,155	2533,169	2765,271	1993,952	2045,932	2782,387	-	-	-	-	-
-	-	2603,203	2827,192	2041,975	2064,017	-	-	-	-	-	-
-	-	2625,062	-	2063,986	2108,176	-	-	-	-	-	-
-	-	2684,950	-	2108,160	2301,084	-	-	-	-	-	-
-	-	2763,263	-	2150,048	2338,162	-	-	-	-	-	-
-	-	2824,228	-	2300,982	2534,348	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	2603,228	2603,460	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	2685,356	2763,400	-	-	-	-	-	-

**APÊNDICE D. ESPECTROS M/Z OBTIDOS A PARTIR DA HIDRÓLISE DO VOLUME RETIDO NO REM COM A FLAVOURZYME®.**

1) Amostra 1; tempo: 0,25 h; padrão 18 a 2000 Da.

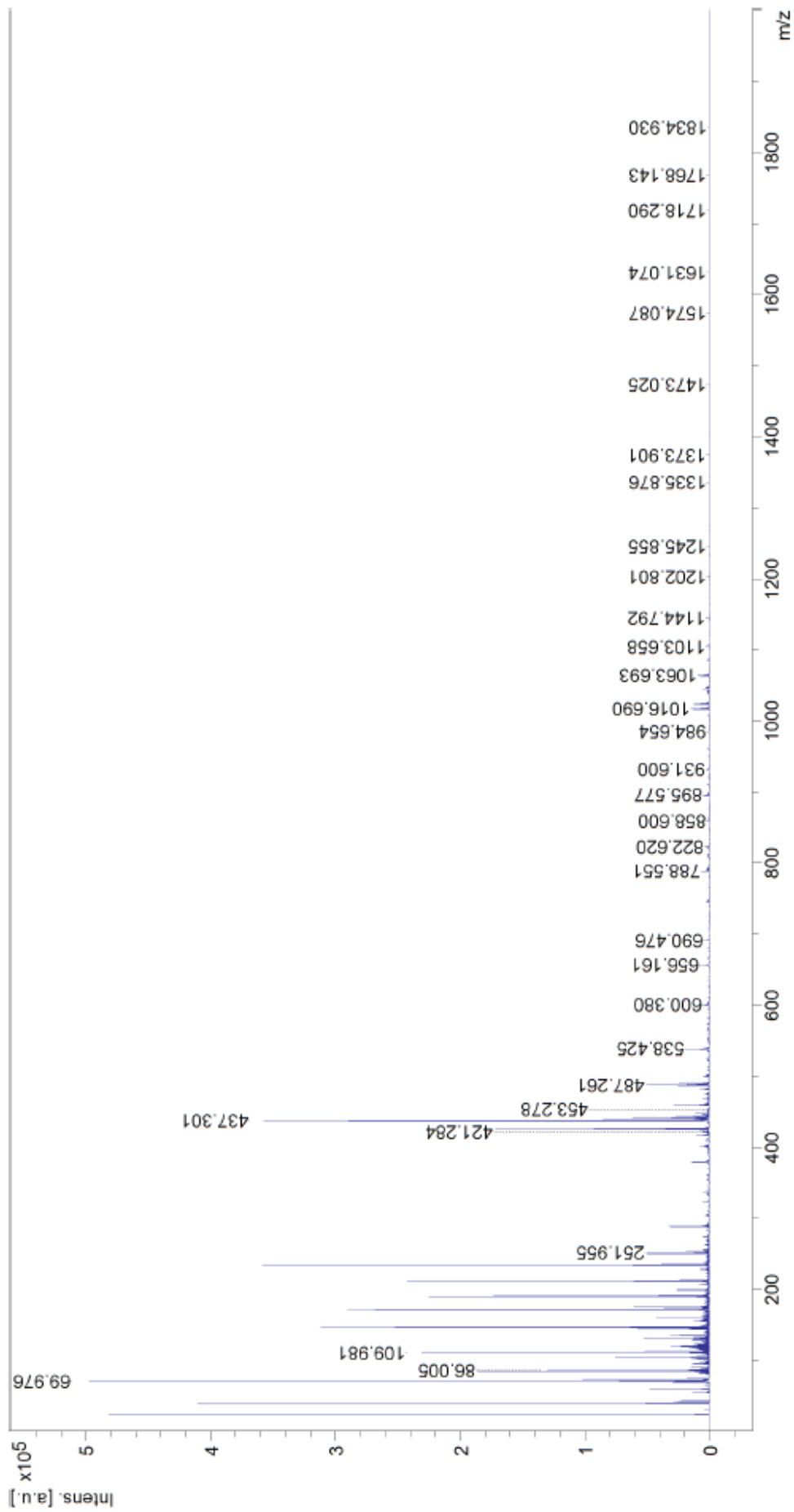


2) Amostra 5; tempo: 1,5 h; padrão 18 a 2000 Da.

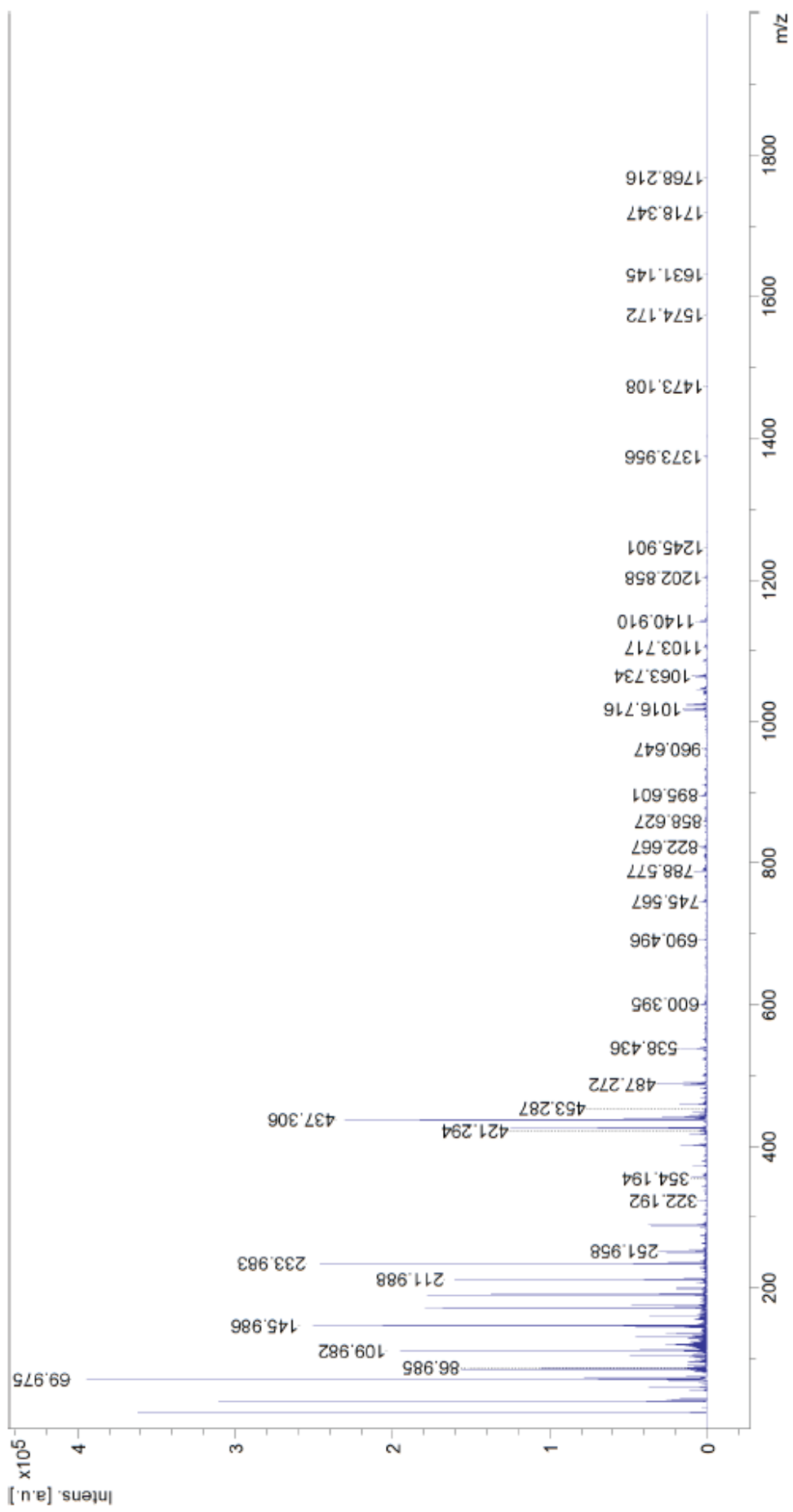




3) Amostra 9; tempo: 3,5 h; padrão 18 a 2000 Da.



4) Amostra 11; tempo 5 h; padrão 18 a 2000 Da.



**APÊNDICE E. DISTRIBUIÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES DOS PEPTÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DA HIDRÓLISE DO VOLUME RETIDO NO REM COM A FLAVOURZYME®.**

	Amostra			
	1	5	9	11
Tempo (h)	0,25	1,5	3,5	5
Perfil m/z dos peptídeos (Da)	69,969	69,974	69,976	55,967
	71,879	83,983	83,985	58,965
	83,979	109,98	86,005	59,971
	86,977	211,986	109,981	62,893
	109,976	425,309	111,998	64,883
	211,981	437,301	249,962	66,956
	425,303	441,069	251,955	67,955
	437,297	441,352	253,952	69,975
	441,074	443,064	421,284	73,987
	443,073	445,168	422,239	75,927
	447,304	447,301	423,685	76,937
	451,313	450,316	425,308	79,952
	453,284	451,308	437,301	80,897
	459,299	453,275	441,079	83,985
	463,299	459,297	443,079	86,985
	466,31	463,286	445,093	109,982
	467,32	467,314	447,305	112,001
	469,299	469,295	450,319	145,986
	472,319	472,31	451,313	146,344
	474,295	487,259	453,278	159,023
	475,285	489,268	459,299	211,988
	481,296	499,262	463,296	233,983
	487,254	535,354	466,299	249,964
	489,262	538,428	467,303	251,958
	497,305	553,412	469,291	253,953
	499,264	557,361	472,301	255,973
	500,349	560,411	474,309	322,192
	501,271	565,404	475,279	354,194
	502,332	568,362	481,289	421,294
	508,326	572,393	487,261	422,244
512,315	582,404	489,269	423,697	
513,319	600,377	499,259	425,316	
521,279	602,39	500,313	437,306	
522,673	603,414	535,357	441,081	
524,32	665,474	538,425	443,074	

524,77	667,468	600,38	444,259
535,352	675,478	602,387	447,313
538,425	680,467	603,409	450,328
560,418	690,479	656,161	451,321
575,413	738,53	665,47	453,287
581,417	745,542	667,454	459,303
582,41	747,546	675,47	463,301
600,373	748,516	680,464	469,304
602,381	752,485	690,476	474,293
622,405	766,509	764,519	476,324
623,418	777,521	766,501	481,299
625,464	781,538	769,5	487,272
675,489	788,555	781,528	489,282
680,462	791,538	788,551	499,277
685,453	792,557	791,543	500,366
687,457	795,522	792,55	501,278
688,494	807,501	794,514	502,345
690,479	809,544	795,497	535,371
696,516	810,587	807,503	538,436
718,516	812,537	809,539	572,408
728,518	817,521	810,604	600,395
733,499	821,558	811,066	602,402
738,522	822,647	811,533	603,421
741,558	832,571	817,515	611,449
745,526	844,579	820,038	675,481
750,497	847,539	821,097	680,479
781,539	851,558	821,544	690,496
788,556	858,604	822,62	738,529
789,619	860,557	843,539	745,567
790,494	862,568	847,557	747,577
792,535	875,621	858,6	764,55
793,078	895,588	860,559	766,55
795,53	898,688	895,577	769,539
808,53	906,615	898,672	780,553
810,616	909,616	907,583	788,577
811,531	920,622	909,614	791,569
814,533	922,62	920,606	794,537
817,536	931,604	922,615	796,538
821,578	933,124	931,6	805,533
822,617	949,606	960,609	807,525
832,575	960,621	984,654	809,543
843,556	1001,661	989,642	810,613
847,584	1005,696	1001,673	811,095

851,587	1007,677	1005,688	813,546
860,585	1009,709	1007,656	818,547
872,578	1015,149	1009,695	821,58
895,598	1016,691	1015,118	822,667
898,68	1022,111	1016,69	831,57
911,628	1023,677	1022,12	843,57
918,631	1030,677	1023,676	851,601
920,639	1038,692	1030,679	858,627
922,625	1039,681	1038,171	860,609
931,611	1041,707	1038,67	862,598
960,647	1045,674	1039,592	895,601
1005,667	1055,762	1041,69	898,685
1016,703	1059,692	1044,098	909,646
1019,704	1060,758	1045,668	920,638
1023,684	1061,654	1055,732	922,627
1038,691	1063,699	1059,185	931,625
1045,685	1079,687	1059,631	933,149
1047,691	1085,695	1063,693	949,641
1051,834	1103,68	1077,666	960,647
1055,754	1106,778	1079,67	1001,702
1059,681	1108,729	1085,682	1005,737
1063,7	1119,76	1101,703	1007,68
1085,698	1122,775	1103,658	1009,773
1106,772	1140,856	1105,667	1012,784
1108,848	1144,787	1106,691	1015,155
1119,721	1162,813	1122,747	1016,716
1122,759	1173,822	1140,851	1023,713
1138,756	1184,774	1144,792	1030,706
1140,842	1191,798	1151,829	1038,716
1144,767	1202,801	1162,784	1039,683
1162,79	1233,829	1172,797	1041,732
1173,84	1245,871	1197,788	1045,711
1178,78	1249,821	1202,801	1047,737
1184,79	1266,833	1222,758	1049,803
1202,789	1335,891	1233,818	1055,763
1231,848	1344,945	1245,855	1060,712
1245,873	1373,915	1266,801	1063,734
1250,841	1395,909	1335,876	1079,716
1256,808	1401,994	1344,918	1085,733
1290,872	1403,951	1373,901	1101,797
1335,891	1463,953	1378,889	1103,717
1344,922	1473,041	1395,863	1106,81
1373,907	1489,015	1401,972	1107,844

1402,02	1502,999	1403,945	1122,797
1403,959	1574,124	1463,959	1140,91
1463,945	1580,128	1473,025	1144,83
1473,006	1590,12	1488,993	1162,885
1502,984	1602,169	1502,948	1173,875
1574,093	1631,095	1574,087	1184,872
1701,69	1654,131	1596,068	1197,853
1718,308	1701,241	1603,19	1202,858
1741,316	1718,312	1609,103	1204,839
1768,14	1740,285	1619,169	1222,835
1791,066	1746,201	1631,074	1233,883
-	1768,174	1653,045	1245,901
-	1784,164	1701,257	1345,004
-	1790,174	1718,29	1373,956
-	1806,21	1740,28	1395,959
-	-	1768,143	1404,013
-	-	1791,436	1473,108
-	-	1834,93	1503,039
-	-	-	1574,172
-	-	-	1631,145
-	-	-	1653,15
-	-	-	1701,319
-	-	-	1718,347
-	-	-	1740,335
-	-	-	1746,218
-	-	-	1768,216
-	-	-	1790,226

## **APÊNDICE F. ARTIGO CIENTÍFICO.**

### **Produção e caracterização de peptídeos de soro de leite em reator enzimático de membrana utilizando hidrólise sequencial**

#### **ABSTRACT**

Whey proteins are a source of amino acids whose biological properties manifest themselves after the cleavage of the peptide bonds. The purpose of this work was to develop a process for obtaining low molecular mass peptides from whey protein concentrate through a combined enzymatic hydrolysis and membrane filtration process. For this, the substrate was subjected to the action of the enzyme Alcalase® 2.4L in an Enzymatic Membrane Reactor (EMR) and the volume retained in the reactor at the end of the process was subjected to the action of the enzyme Flavourzyme® 1000L in a batch reactor. The first process was stable for 14 hours reaching a degree of hydrolysis of 22%, resulting in peptides with molecular mass between 400 and 3400 Da, approximately. Sequential hydrolysis resulted in peptides with molecular mass between 80 and 1800 Da, with antioxidant activity 16 times higher than those obtained in the first hydrolysis. The combination of the two processes allowed the recovery of 100% of the protein fed.

Key-words: biopeptides. Sequential Hydrolysis. Molecular Mass

## **1. INTRODUÇÃO**

As proteínas do soro de leite são fonte de peptídeos biologicamente ativos, liberados através da hidrólise enzimática (KORHONEN; PIHLANTO, 2006). A administração oral de peptídeos bioativos pode afetar os principais sistemas do corpo humano: cardiovascular, digestivo, endócrino, nervoso e imunológico. O potencial de sequências específicas de

biopeptídeos tem despertado crescente interesse científico e comercial, como aliados nas formulações para necessidades nutricionais específicas, como o caso de pessoas com alergias às proteínas do leite e fenilcetonúricos, para promover a saúde humana, reduzindo o risco de doenças crônicas ou aumentando a proteção imune natural (HARTMANN; MEISEL, 2007, KORHONEN, 2009, NONGONIERMA; FITZGERALD, 2015).

Hidrolisados proteicos contendo principalmente di e tri-peptídeos são absorvidos mais rapidamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres e proteínas intactas, maximizando a liberação de nutrientes para o corpo, o que é particularmente importante na suplementação dietética de idosos, recém-nascidos prematuros e nutrição de esportistas (SAHA; HAYASHI, 2001, AFONSO, 2008, BRANDELLI et al., 2015).

Vários estudos tem demonstrado que o peso molecular, a composição e sequência aminoacídica dos peptídeos, e particularmente a presença de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, tem influência direta na sua ação antioxidante (PENG; XIONG; KONG, 2009, PHELAN et al., 2009, SARMADI; ISMAIL, 2010, CHEUNG et al., 2012, CORRÊA et al., 2014, BRANDELLI et al., 2015, AHMED et al., 2015). O tamanho, especialmente na faixa de 0,5 – 3 kDa, tem sido sugerido como fator crucial que afeta a atividade antioxidante de peptídeos (CHEUNG et al., 2012).

O uso combinado de enzimas, como as endo e exoproteases, é frequentemente utilizado para obter produtos finais com características específicas, como amargor reduzido, distribuição molecular, ausência de sequências ou de aminoácidos específicos, como a fenilalanina, para pacientes fenilcetonúricos (GALVÃO et al., 2009, SPELLMAN; O'CUINN; FITZGERALD, 2009, SUJITH; HYMAVATHI, 2011)

Os reatores enzimáticos membranas (REM) têm sido especialmente úteis na produção de hidrolisados. O uso de processos combinados, reação e separação, operando em modo contínuo, apresentam vantagens como: a remoção dos peptídeos do meio reacional evitando o



problema de inibição e atingindo altos valores de conversão; o peso molecular dos produtos é controlado pelo peso de corte da membrana; o reciclo da enzima ao tanque de reação possibilita menor custo de operação, assim como a dispensa da temperatura para inativação, que certamente teria um alto custo energético (PEREA; UGALDE, 1996, CHEISON et al., 2006; PRIETO et al., 2007, TAVARES et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi produzir peptídeos a partir de um concentrado proteico de soro de leite utilizando uma combinação de processos de hidrólise enzimática e separação por membranas. A performance dos processos hidrolíticos e da ultrafiltração da solução hidrolisada foi monitorada, e posteriormente os produtos obtidos ao longo dos processos foram caracterizados quanto a distribuição molecular, atividade antioxidante e atributos de sabor.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 MATERIAIS**

Foi utilizado CPS com aproximadamente 82 % de proteína obtido, apropriadamente diluído antes do uso. As enzimas utilizadas foram a Alcalase<sup>®</sup> 2.4 L FG, uma serino endopeptidase de origem microbiana produzida a partir de *Bacillus licheniformis*, e a Flavourzyme 1000L, uma aminoexoprotease, ambas fabricada pelo laboratório Novozymes.

A membrana utilizada foi uma membrana plana de ultrafiltração fabricada pela Osmonics G.E, modelo YMPTSP3001 cujo material de confecção é polietersulfona, com massa molecular de corte de 5000 Da.

### **5.2 OPERAÇÃO DO REATOR ENZIMÁTICO DE MEMBRANA (REM)**

Antes dos experimentos com hidrólise a membrana foi caracterizada utilizando-se água e solução proteica a 50 g.L<sup>-1</sup> sem adição de enzima, com temperatura de 55 °C e pH ajustado

para 8,5, com o objetivo de verificar a estabilidade do sistema dentro do intervalo de pressão testado.

A configuração do REM utilizada foi semelhante ao descrito por Mannheim e Cheryan (1990). O tanque de reação foi alimentado com 0,5 L de solução de CPS contendo 50 g.L<sup>-1</sup> de proteína, mantido a temperatura de 55 °C e pH ajustado para 8,5 com adição de NaOH 1N. Após a padronização da solução a enzima pré-dissolvida foi adicionada e deu-se início a filtração. O pH foi mantido constante através da adição de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>.

A pressão transmembrana foi ajustada para 1 bar, e o volume da corrente de rejeito contendo proteínas parcialmente hidrolisadas e a enzima foi continuamente reciclado para o reator, cujo volume foi mantido constante através da alimentação contínua de substrato.

O fluxo de permeado ( $F_p$ ) é obtido através da Equação 1.

$$F_p = \frac{V}{t.A} \quad (16)$$

sendo:  $V$ : volume de permeado coletado num determinado tempo;  $t$ : tempo de obtenção do permeado durante o qual a amostra foi coletada;  $A$ : área de filtração da membrana.

Em estudos preliminares observou-se que em até 1 bar de pressão o fluxo mostra relação linear com a pressão, ou seja, fenômenos como polarização e incrustação são minimizados. Na região onde o fluxo passa a ser independente da pressão, este passa a ser controlado pela transferência de massa através da camada limite formada. Por este motivo, esta pressão foi definida como a pressão de trabalho para o processo de hidrólise.

### 5.2.1 Análise de resistências

A dependência do fluxo em relação a pressão é dada pela Equação 2, de acordo com a Lei de Darcy (GÉSAN-GUISIOU, 1999):

$$F_p = \frac{\Delta P}{\mu \cdot R_t} \quad (17) \quad 1$$

sendo:  $F_p$ : é o fluxo do permeado;  $\Delta P$ : é a pressão transmembrana;  $R_t$ : é a resistência total imposta ao fluxo;  $\mu$ : é a viscosidade dinâmica do fluido. Para o caso de filtração de produtos de soro, a Equação 2 pode ser reescrita com base no modelo de resistência em série:

$$F_p = \frac{\Delta P}{\mu(R_m + R_p + R_i)} \quad (18)$$

sendo:  $R_m$ : é a resistência imposta pela membrana limpa;  $R_p$ : é a resistência devido a polarização por concentração (reversível);  $R_i$ : é a resistência devido a incrustação (irreversível). Para o caso de o fluido ser exclusivamente água a única resistência é a oferecida pela membrana limpa,  $R_m$ :

$$R_m = \frac{\Delta P}{\mu_a \cdot F_p} \quad (19)$$

Após o enxágue da membrana depois do processo de filtração do hidrolisado, a resistência formada pela polarização por concentração é removida ( $R_p = 0$ ), e o fluxo medido com água permite o cálculo de  $R_i$ :

$$R_i = \frac{\Delta P}{\mu * F_p} - R_m \quad (20)$$

Conhecida a resistência total (Equação 2) a partir dos experimentos com a solução proteica foi possível calcular  $R_p$  (GÉSAN-GUISIOU, 1999, BRIÃO; TAVARES, 2012):

### 5.3 TRATAMENTO DA SOLUÇÃO PROTEICA RETIDA NO REM COM EXOPROTEASE

Ao final do processo a solução proteica contida no reator foi submetida a hidrólise em reator batelada equipado com membrana, utilizando a enzima Flavourzyme 1000L®, nas condições ótimas para a enzima conforme recomendado pelo fabricante: pH 6,0, temperatura 50°C e relação enzima:substrato de 0,01. O pH do meio foi corrigido com NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>.

### 5.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 5.4.1 Grau de hidrólise

A avaliação do grau de hidrólise foi feita através equação 6, sugerida por Guadix et al. (2006), análoga àquela proposta por Adler- Nissen (1986) para hidrólise em batelada, porém, com modificações para o caso de hidrólise contínua.

$$\%GH = \frac{\left( M_B - V_P \left( \frac{K_W}{10^{-pH}} \right) \right) \frac{1}{\alpha}}{(V_R + V_P) S_F h_T} * 100\% \quad (21) \quad ($$

sendo:  $M_B$ : mols de base consumidos para manter o pH constante (mol);  $V_P$ : volume de permeado acumulado (L);  $V_R$ : volume de reação (L);  $K_W$ : produto iônico da água a 50°C:  $5,8 \times 10^{-14}$ ;  $\alpha$ : grau de dissociação médio dos grupos  $\alpha$ - NH: 0,935;  $S_F$ : concentração proteica do substrato (g<sub>proteína</sub>/L);  $h_T$ : número total de ligações peptídicas em mol/g<sub>proteína</sub> : 0,0088 para proteínas do soro (ADLER- NISSEN, 1986).

#### **5.4.2 Distribuição da massa molecular dos peptídeos por MALDI-TOF**

A distribuição das massas moleculares dos peptídeos foi determinada utilizando um espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Alemanha), pertencente ao Laboratório Central de Biologia Molecular - Cebime da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis – SC).

As amostras de hidrolisado foram diluídas 10 vezes em solução de água contendo 0,1% de ácido trifluoracético. Um microlitro desta diluição foi sobreposto, em triplicata, na placa alvo para MALDI (Anchor Chip™ MALDI – Bruker Daltonics, Alemanha) e foi seco em temperatura ambiente. Após, um microlitro de matriz (10 mg/ml de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico – CHCA – em solução de água e acetonitrila 50% contendo 0,1 % ácido trifluoracético) foi adicionada ao hidrolisado e a mistura permaneceu novamente em temperatura ambiente para secar. Após a secagem, os espectros foram adquiridos usando um espectrômetro Autoflex III Smartbeam (Bruker Daltonics, Alemanha), operado no modo refletor positivo com intensidade do laser de 40% e frequência de 100Hz. A calibração foi feita usando peptídeos padrão de calibração cobrindo o intervalo de massa entre 700-4000 Da (Bruker Daltonics, Alemanha). As análises foram conduzidas em triplicata.

#### **5.4.3 Atividade Antioxidante dos peptídeos**

A atividade antioxidante dos peptídeos foi determinada através do método ABTS, proposto por Re et al. (1999). Para a construção da curva padrão de Trolox foram elaboradas soluções com concentrações de 100 até 900  $\mu\text{M}$  diluídas em álcool etílico, as quais reagiram com a solução de radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  (na proporção de 10  $\mu\text{L}$ :1 mL, respectivamente) durante 6 minutos, e a absorbância foi lida à 734 nm. As amostras de hidrolisados reagiram com a solução de radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  (na proporção de 20  $\mu\text{L}$ :980  $\mu\text{L}$ , respectivamente) durante 6 minutos e foram lidas nas mesmas condições que as amostras da curva. O espectrofotômetro foi zerado com

álcool etílico PA em 734 nm e o branco considerado foi a solução de radical ABTS<sup>•+</sup>. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata.

A atividade antioxidante foi expressa em Trolox equivalente ( $\mu\text{mol TE}/\text{mg}$  proteína da amostra) a partir da equação da reta ajustada para a curva do padrão Trolox, de acordo com a Equação 14, onde  $ABS_{734\text{nm}}$ : absorvância da amostra lida a 734 nm.

$$AA = \frac{((Abs_{734\text{nm}} * a) + b) (\mu\text{mol TE})}{\text{mg de proteína}} \quad (22)$$

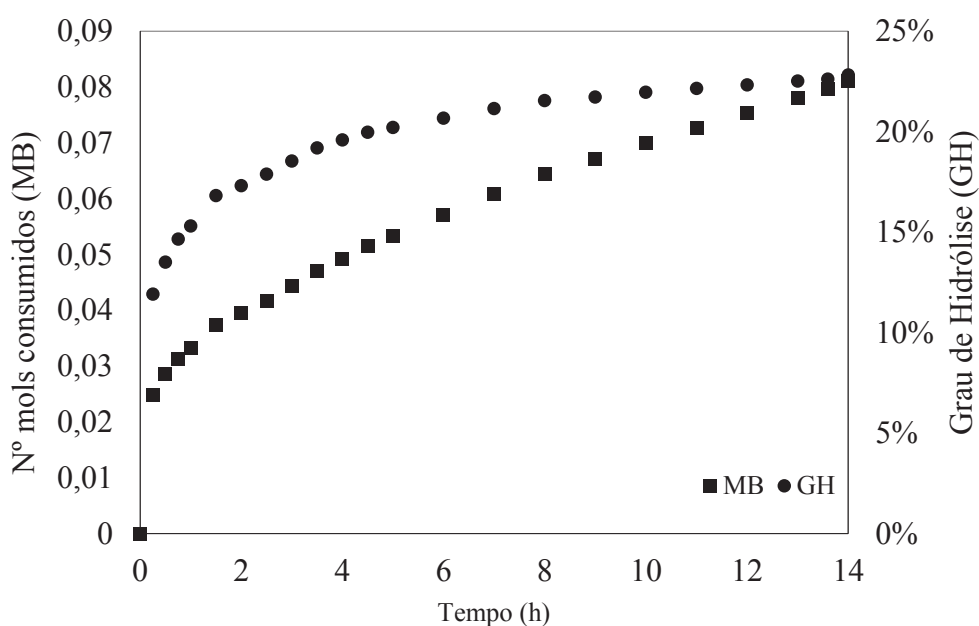
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 6.1 CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO NO BIORREATOR À MEMBRANA

##### 6.1.1 Grau de hidrólise

A quantidade de mols de base consumidos para manter o pH do meio constante forneceu condições para o cálculo do GH ao longo do processo. Os dados são apresentados na Figura 1.

Figura 34. Avanço do grau de hidrólise das proteínas do CPS utilizando a enzima Alcalase® 2.4L no REM.



Ao final do processo, em 14 horas, o grau de hidrólise máximo alcançado foi de 22,81%, ou seja, 22,81% das ligações peptídicas presentes foram hidrolisadas, o que está de acordo com os dados do fabricante da enzima (GH máximo de 25%) e muito próximo a valores obtidos por outros autores (PESSATO et al., 2016, GUADIX et al., 2006, PEREA et al., 1993).

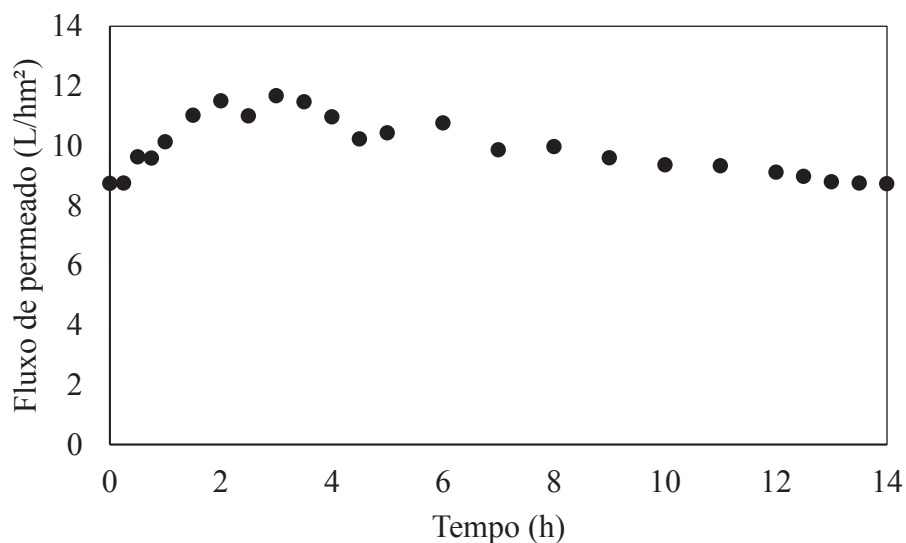
A evolução da curva MB mostra uma inclinação constante a partir da 8ª hora de operação, assim como a curva de GH, o que significa uma taxa constante de hidrólise no reator. Este comportamento sugere que o consumo de base a partir deste ponto foi devido apenas a hidrólise da alimentação entrando no reator, e que todas as ligações peptídicas disponíveis na carga inicial alimentada já haviam sido hidrolisadas. Moreno e Cuadrado (1993) sugerem que esta tendência das curvas de hidrólise pode ser atribuída ao decréscimo das ligações peptídicas disponíveis para a hidrólise e também a diminuição da atividade enzimática, entre os principais fatores.

Não foi possível medir o GH da hidrólise do volume retido com a Flavourzyme® pelo método do pH-stat pois o pH não se alterou durante a hidrólise. É provável que isso tenha ocorrido devido ao tamponamento do sistema.

### **6.1.2 Fluxo de permeado no REM**

O biorreator foi operado durante 14 horas, quando o fluxo de permeado atingiu estabilidade. A evolução do fluxo de permeado é apresentada na Figura 2:

Figura 35. Evolução do fluxo de permeado no REM ao longo de 14 horas de operação contínua com hidrólise e separação de peptídeos.



O fluxo inicial de permeado foi de 8,8 L/hm<sup>2</sup> e foi superior ao fluxo de permeado não hidrolisado apresentado quando a pressão de 1 bar foi aplicada (6,21 L/hm<sup>2</sup>, dados não mostrados), indicando que a hidrólise efetivamente reduziu o tamanho das proteínas, mesmo nos primeiros minutos da reação.

O fluxo de permeado mostrou um comportamento crescente incomum até a 3<sup>a</sup> hora de operação. Tal comportamento não tem histórico na literatura, no entanto, algumas suposições podem ser feitas. É possível que o aumento do fluxo esteja associado ao avanço do GH e diminuição do tamanho dos peptídeos formados em tamanhos mais próximos ao corte da membrana, facilitando sua passagem, enquanto a incrustação não é significativa. Com o avanço do GH também se alteram as propriedades do substrato, como a viscosidade e a hidrofobicidade, ambos com efeito na hidrodinâmica do fluxo (LIU; XU, 1998, CHEISON; WANG; XU, 2007). Os hidrolisados são mais hidrofóbicos do que a proteína intacta e podem interagir entre eles assim como com a superfície hidrofóbica da membrana (CHERYAN, 1998).

Além da relação com o GH, o comportamento tortuoso do fluxo, principalmente no período inicial pode estar associado também à polarização por concentração. Segundo Cheison, Wang e Xu (2007), a própria camada formada pela polarização por concentração, sendo um



substrato, é passível de modificação enzimática a ponto de influenciar a dinâmica do fluxo de permeado.

Somente a partir da 3ª hora de operação o fluxo começa a decair de modo contínuo, característica do efeito da incrustação dos poros da membrana. Chollangi e Hossain (2007), afirmaram que o fluxo de permeado diminui à medida que aumenta a concentração da solução, mas em concentrações abaixo da faixa de 20 a 48 g/L a queda no fluxo é menos expressiva, devido a intensidade da incrustação ser menor. A estabilidade do fluxo a partir da 12ª hora de operação justificou a interrupção do processo.

### 6.1.3 Resistências ao fluxo no REM

A Tabela 1 apresenta as resistências presentes e a contribuição de cada uma no sistema, utilizando-se a viscosidade da água como aproximação.

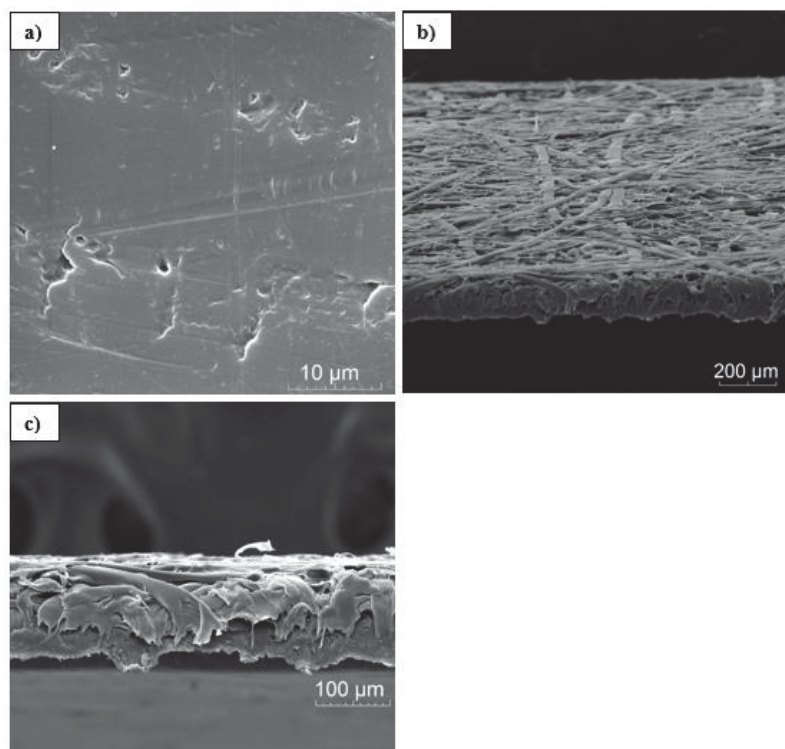
Tabela 6. Resistências associadas ao fluxo de permeado durante operação do REM.

Unidade	$R_t$	$R_m$	$R_i$	$R_p$
$m^{-1}$	$3,64 \times 10^{13}$	$7,41 \times 10^{12}$	$2,81 \times 10^{13}$	$9,50 \times 10^{11}$
%	-	20,35	77,05	2,61

A resistência devido à incrustação foi a causa mais significativa para a redução do fluxo de permeado, seguida pela resistência imposta pela membrana, e enfim, pela resistência devido à polarização por concentração. Enquanto a polarização por concentração é um fenômeno fluido dinâmico, a incrustação é resultado de um fenômeno químico entre o soluto e a membrana (GIRARD, FUKUMOTO, 2000).

Após o enxágue para determinação da resistência devido à incrustação a membrana foi submetida a análise no microscópio eletrônico de varredura – MEV, cujas vistas são apresentadas na Figura 3.

Figura 36. Microscopia eletrônica de varredura da membrana após ultrafiltração e enxágue: a) vista do topo em escala de 100  $\mu\text{m}$ ; b) vista do fundo em escala de 200  $\mu\text{m}$ ; c) vista da seção transversal (fratura) em escala de 100  $\mu\text{m}$ .



Pode-se observar na figura a) que os poros da membrana estão cobertos por uma camada de proteínas que se depositaram na sua superfície, característica da incrustação. Através do corte transversal na figura c), cuja superfície polimérica está virada para baixo, é possível ver uma fina camada (espessura aproximada de 10  $\mu\text{m}$ ) com coloração mais clara que representa as proteínas incrustadas. Tais resultados corroboram com aqueles referentes ao fluxo de permeado que não mostrou redução expressiva, já que a incrustação da membrana não foi severa.

Dada a configuração do REM, onde a vazão da corrente de permeado é a mesma vazão da corrente de alimentação, o volume de reação permanece constante e ao final do processo o reator contém proteínas parcialmente hidrolisadas que ainda não permearam a membrana. Considerando que: a) as ligações peptídicas disponíveis para atuação da Alcalase<sup>®</sup> foram hidrolisadas, conforme o gráfico apresentado na Figura 9; b) a ação das endoproteases expõe as ligações peptídicas antes inacessíveis para o caso das enzimas exoproteolíticas, o que

facilitaria sua ação e c) a tendência ao amargor pode ser reduzida substancialmente utilizando exoproteases, a solução proteica retida no volume do reator foi direcionada para um reator batelada para um novo processo enzimático com exoprotease.

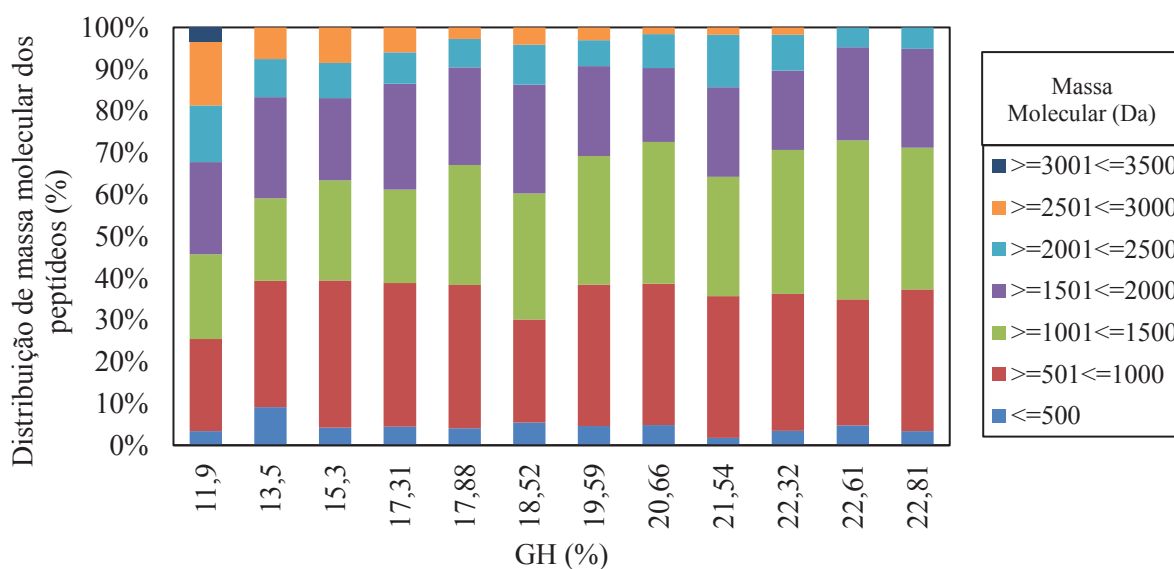
## 6.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS PEPTÍDEOS

### 6.2.1 Distribuição de massa molecular dos peptídeos obtidos no REM

A Figura 4 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.

Na faixa de massa apontada como  $\leq 500$  Da, a menor massa molecular detectada foi de 437 m/z. Como investigação, as amostras correspondentes aos GH de 11,90%, 20,66% e 22,81% foram submetidas a análise com padrões entre 0 a 100 Da e 100 a 200Da (dados não mostrados), e todos os picos detectados nas amostras foram encobertos pelos picos da matriz, ou seja, não foram detectados aminoácidos livres ou peptídeos com massa abaixo de 437 m/z.

Figura 37. Distribuição de massas moleculares dos peptídeos do permeado em função do Grau de Hidrólise.



De modo geral, é possível perceber que à medida que o GH aumenta, diminui o tamanho dos peptídeos. Os maiores peptídeos, com massas de 2870,06, 2887,03, 3410,35 e 3428,38 m/z,

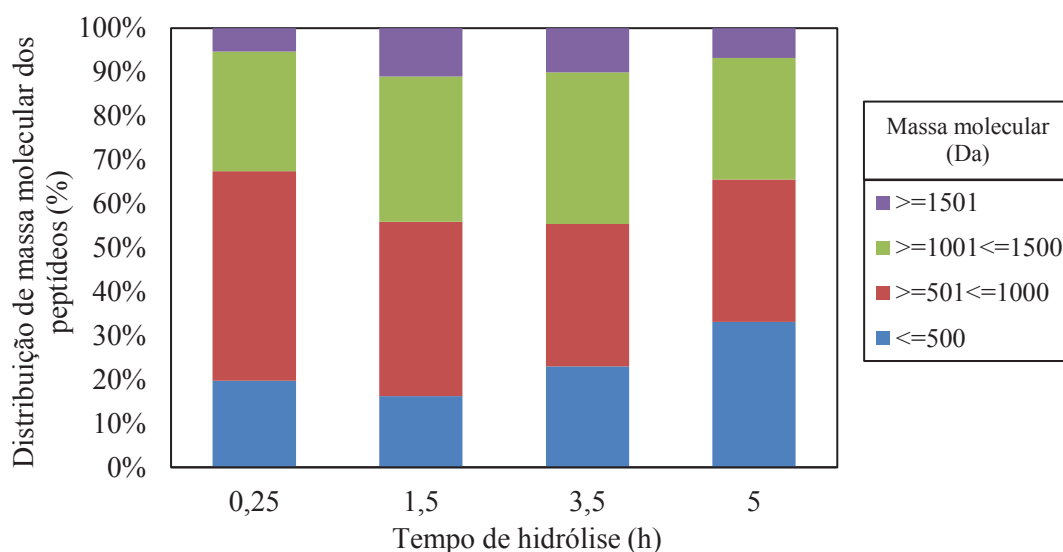
foram detectados apenas na amostra 1, correspondente a um GH de 11,90%. A partir da amostra 2 até a 23, com GH entre 13,50% e 22,81%, nenhum peptídeo com massa acima de 2827,19 m/z foi detectado.

À medida que o GH aumenta, aumentam a intensidade dos picos referentes aos peptídeos de menor massa nos espectros m/z das amostras. Algumas massas tiveram picos com maior intensidade nas amostras iniciais e gradualmente diminuíram em até que desaparecem, indicando que estas moléculas foram hidrolisadas em massas menores (dados não apresentados).

### **6.2.2 Distribuição de massa molecular de peptídeos obtidos no tratamento da solução proteica retida do REM com exoprotease**

As amostras obtidas pela ação da Flavourzyme<sup>®</sup> foram avaliadas em um intervalo de massas de até 5000 Da, no entanto, não houve detecção acima de 2000 Da. A Figura 5 mostra a distribuição das massas moleculares dos peptídeos obtidos pelo tratamento do volume retido no REM com a Flavourzyme, em relação ao tempo de hidrólise, já que o GH não pôde ser medido neste processo.

Figura 38. Distribuição molecular dos peptídeos gerados a partir da hidrólise do volume retido no REM com exoprotease.



A medida que o processo avança, 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 1000 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.

O interesse na obtenção de pequenos peptídeos, di-, tri- e tetrapeptídeos, está relacionado à sua biodisponibilidade, uma vez que podem ser capazes de sobreviver à digestão gastrointestinal. Le Maux et al. (2015) avaliaram o efeito de hidrolisado de soro nanofiltrado em membrana de 200 Da na inibição da enzima dipeptidil peptidase IV e encontraram que a atividade do hidrolisado permeado (<200 Da) foi significativamente maior comparada a atividade do hidrolisado não filtrado e do retentado. No permeado os autores conseguiram identificar 16 compostos, sendo oito aminoácidos, sete dipeptídeos e um tetrapeptídeo (447.295 Da), confirmando a importância de pequenos peptídeos na ação inibitória.

Silva et al. (2009) avaliaram o perfil molecular de peptídeos de soro gerados pelas enzimas Protezyn<sup>®</sup> L, uma serino protease cuja origem é o *Bacillus subtilis*, semelhante à Alcalase<sup>®</sup>, e a Flavourzyme<sup>®</sup>, entre outras. Os peptídeos obtidos com a Protezyn<sup>®</sup> apresentaram maior teor de oligopeptídeos, sendo que a fração com mais de 7 resíduos de aminoácidos representou 72,25% e os aminoácidos livres representaram 0,70% (% nmols). Já nos peptídeos obtidos com a Flavourzyme, a fração de oligopeptídeos com mais de 7 resíduos representou 18,76% e a fração de aminoácidos livres representou 18,43%. Tais resultados estão de acordo com os observados neste trabalho, onde não foi possível detectar aminoácidos livres nos peptídeos gerados pela Alcalase<sup>®</sup>, enquanto que aqueles gerados após o tratamento do volume retido no REM com a Flavourzyme apresentaram massas menores do que 200 Da.

### 6.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PEPTÍDEOS

A atividade antioxidante dos peptídeos obtidos no REM mostrou tendência de aumento com o aumento do GH, conforme mostra a Figura 6. Todas as amostras mostraram aumento na AA quando comparadas com a proteína não hidrolisada (CPS 5%, tempo 0 h apresentado na Figura 6) que apresentou AA de 60  $\mu\text{mol TE/g}$  de proteína. Especificamente, a AA aumentou cerca de 9 vezes com a hidrólise enzimática (a partir da média dos resultados).

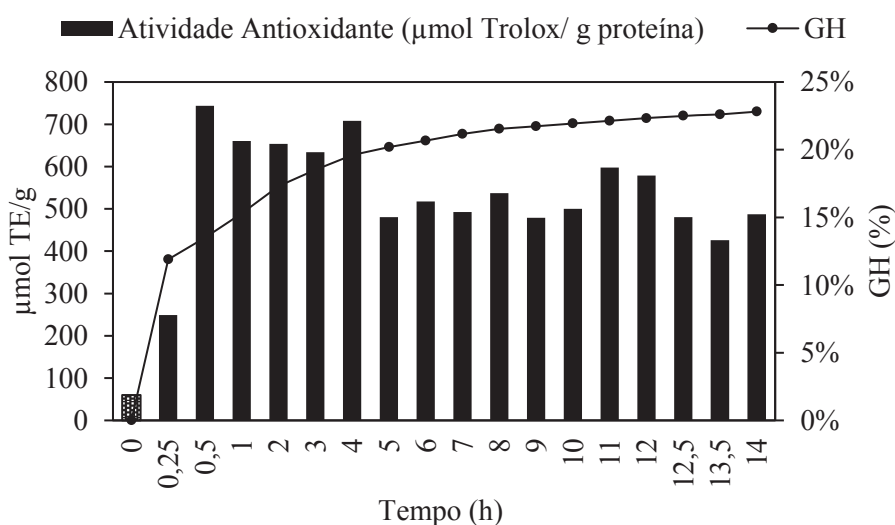
Contudo, depois de um GH de aproximadamente 15% os valores de AA oscilaram, mantendo uma média de 608,25  $\mu\text{mol TE/g}$  até 22,4% de GH (até 4 horas de processo) e 507,10  $\mu\text{mol TE/g}$  entre 23,2 e 25,6% de GH (a partir de 5 horas até o final do processo). Tais resultados sugerem que, para as condições de substrato, enzima e relação enzima:substrato utilizadas neste trabalho, pode haver um GH crítico a partir do qual a AA é pouco ou negativamente influenciada e que pode não ser necessário uma extensa hidrólise para a formação de peptídeos com potencial antioxidante, interpretação também relatada nas discussões de Cheung et al. (2012).

Comportamento similar foi relatado pelos autores Önay-Uçar et al. (2014), Peng, Xiong, e Kong (2009) e Corrêa et al. (2014), que encontraram AA 3,2 vezes maior no hidrolisado do que na proteína de soro não hidrolisada, no entanto, embora a maior AA foi alcançada no maior GH, após 1 hora até 6 horas de hidrólise as diferenças não foram significativas.

Segundo Sarmadi e Ismail (2010), a atividade antioxidante de peptídeos gerados através da hidrólise de proteínas está relacionada com a exposição de grupos hidrofóbicos antes inativos na sequência original da proteína intacta, e isto explica a maior AA dos peptídeos em relação ao CPS, assim como o aumento da AA com o aumento do GH, quando mais resíduos são expostos.

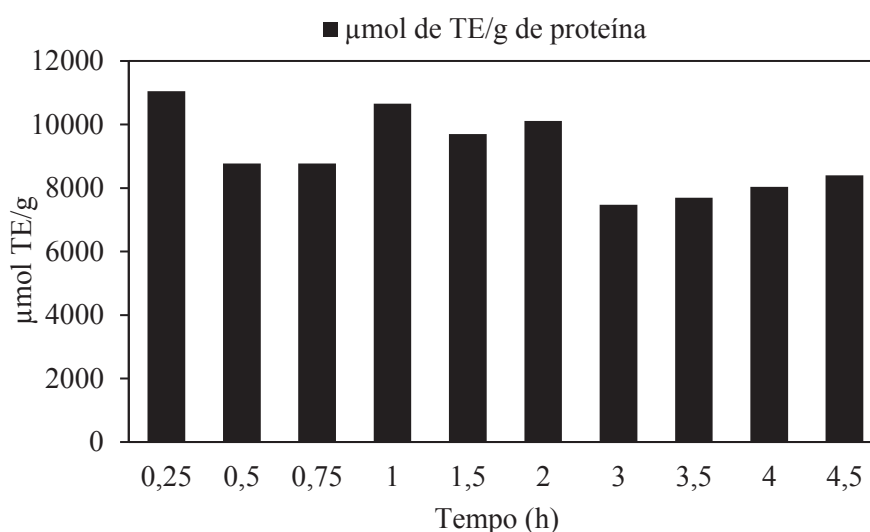
Cheung et al. (2012) avaliaram a atividade antioxidante de hidrolisados de peixe com diferentes proteases através do método ABTS e todas as amostras apresentaram alto potencial antioxidante, independentemente do tipo de protease, concluindo que o tamanho molecular dos peptídeos é o principal aspecto contribuinte para a sua AA. Assim, a hidrólise é essencial para a ativação da atividade antioxidante das proteínas do soro.

Figura 39. Atividade antioxidante dos peptídeos.



A atividade antioxidante dos peptídeos obtidos pela hidrólise do volume retido no REM com a Flavourzyme®, Figura 7, foi significativamente maior (aprox. 16 vezes) comparada a atividade obtida pela hidrólise com a Alcalase®. A maior AA dos peptídeos obtidos pela ação da Flavourzyme® em relação à Alcalase® reflete a maior acessibilidade dos pequenos peptídeos aos radicais e ao grau de liberdade de possíveis resíduos de aminoácidos responsáveis pela ação antioxidante. De fato, ainda que a hidrólise sob ação da Flavourzyme® tenha produzido peptídeos com maior atividade antioxidante, deve-se observar que grande parte deste potencial vem da primeira etapa de hidrólise conduzida com a Alcalase®.

Figura 40. Atividade antioxidante de peptídeos obtidos pela hidrólise do volume retido no REM com a Flavourzyme®.



Diferente do observado na primeira hidrólise (Fig. 6), os altos valores de AA (Fig. 7) foram alcançados logo no início do processo, porém, é possível identificar a mesma tendência de diminuição e estabilização, neste caso, a partir do tempo de 3 horas. Claramente, não é só o tamanho dos peptídeos os responsáveis pelo seu potencial antioxidante, já que, neste caso, o



aumento no GH, tanto para a hidrólise com a Alcalase® quanto com a Flavourzyme® não produziu igual resposta na AA.

Cheung et al. (2012) utilizaram uma coluna cromatográfica para separar frações de hidrolisados de peixe entre três diferentes tamanhos, sendo que a fração <1400 Da apresentou aproximadamente o dobro da atividade de captura de radicais ABTS quando comparada às frações de até 3600 Da, confirmando que o tamanho dos peptídeos abaixo de 1400 Da é o fator dominante para a atividade antioxidante. No entanto, variações na atividade de captura de radicais ABTS de diferentes hidrolisados (diferentes enzimas) na fração <1400 Da sugere que a composição peptídica também exerce algum efeito na atividade antioxidante.

Tais resultados indicam que outros fatores, como o substrato, a especificidade da enzima, a composição dos peptídeos, ou seja, a sequência aminoacídica também influenciam a AA dos peptídeos produzidos. Além disso, vários autores têm demonstrado que aminoácidos hidrofóbicos entre as sequências são um fator chave na habilidade dos peptídeos de sequestrar radicais (CHEUNG et al., 2012, AHMED et al., 2015, SARMADI e ISMAIL, 2010).

Corrêa, et al. (2014) isolaram uma fração de hidrolisado com a maior atividade antioxidante e identificaram como sendo um peptídeo com um resíduo hidrofóbico na posição N-terminal seguido alternadamente de resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos. Os autores indicam que os mecanismos de sequestro de radicais de peptídeos bioativos podem estar relacionados com a prevalência de resíduos de aminoácidos não polares, tais como Leu, Ala, Pro, Val e Phe. Similarmente, AHMED et al. (2015) identificaram peptídeos com alta atividade antioxidante que continham abundância de resíduos hidrofóbicos como Tyr, Phe, Pro, Ile, e Leu entremeados com resíduos polares, cuja natureza anfifática parece melhorar a atividade sequestrante de radicais através do aumento da solubilidade do peptídeo, facilitando a interação e troca de prótons com as espécies radicais.

De um modo geral é possível verificar que a hidrólise do volume retido com a Flavouzyme®, dada a sua ação exoproteolítica, além de diminuir o tamanho da cadeia peptídica, pode ter exposto resíduos hidrofóbicos, o que contribuiu para a maior atividade antioxidante destes peptídeos comparado aos peptídeos gerados pela ação da Alcalase 2.4L®, somente.

#### **4. CONCLUSÕES**

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 escolha de uma concentração proteica menor e pressão de operação mais branda permitiu que o REM operasse com estabilidade, sem reduções bruscas no fluxo e com melhor aproveitamento da enzima. Também, a escolha da massa molecular de corte da membrana, de 5 kDa, se mostrou adequado pois os peptídeos recuperados tiveram massas moleculares menores do que 3,5 kDa, que era a faixa de interesse de acordo com as propriedades nutricionais que exibem. Previsivelmente, a formação de uma barreira secundária na superfície da membrana, resultado dos fenômenos de incrustação e formação de uma camada de gel, contribuiu para que peptídeos maiores não a permeassem.

O sistema proposto neste trabalho, composto por um reator enzimático de membrana operando em modo contínuo seguido por um reator em batelada para o processamento do volume retido no primeiro permitiu a recuperação de 100% da carga proteica alimentada, provando ser um sistema eficiente e sustentável.

Além da recuperação proteica, a combinação dos processos permitiu a obtenção de peptídeos com perfis diferentes; e mais especificamente, permitiu a obtenção de peptídeos com maior potencial antioxidante e melhor perfil sensorial: menos amargo e mais umami, características que são fundamentais para aplicações em alimentos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins* (p. 427). London: Elsevier Applied Science Publishers Ltd.

AFONSO, W. O. **Obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico do soro de leite com elevado teor de di-tripeptídeos para utilização em nutrição clínica.** Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

AHMED, A. S.; EL-BASSIONY, T.; ELMALT, L. M.; IBRAHIM, H. R. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. **Food Research International**, v.74, p. 80-88, 2015.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. **Food Research International**, v. 73, p. 149-161, 2015.

BRIÃO, V. B.; TAVARES, C. R. G. Pore blocking mechanism for the recovery of milk solids from dairy wastewater by ultrafiltration. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 02, p. 393-407, 2012.

CHEISON, S. C.; WANG, Z.; XU, S. Y. Hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor I. Characterisation of permeate flux and product recovery by multivariate data analysis. **Journal of Membrane Science**, v. 283, p. 45-56, 2006.

CHEISON, S. C.; WANG, Z.; XU, S. Y. Use of response surface methodology to optimise the hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 1134-114, 2007.

CHERYAN, M. *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. Technomic Publishing Co., Lancaster, PA, 2ª ed., 1998, p. 526.

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.

CHOLLANGI, A.; HOSSAIN, M. M. Separation of proteins and lactose from dairy wastewater. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 398-404, 2007.

CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; FONTOURA, R.; MEIRA, S. M. M.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. **Peptides**, v. 61, p. 48-55, 2014.

GALVÃO, C. M. A.; PINTO, G. A.; JESUS, C. D.F.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L.C. Producing a phenylalanine-free pool of peptides after tailored enzymatic hydrolyses of cheese whey. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p. 109-117, 2009.

GUADIX, A.; CAMACHO, F.; GUADIX, E. M. Production of whey protein hydrolysates with reduced antigenicity in a stable membrane reactor. **Journal of Food Engineering**, v. 72, n. 4, 398-405, 2006.

GÉSAN-GUISIOU, G.; BOYAVAL, E.; DAUFIN, G. Critical stability condition in crossflow microfiltration of skimmed milk: transition to irreversible deposition. **Journal of Membrane Science**, v. 158, p. 211-222, 1999.

GIRARD, B.; FUKUMOTO, L. R. Membrane Processing of Fruit Juices and Beverages: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 91-157, 2000.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 163-169, 2007.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 177-187, 2009.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 945-960, 2006.

LE MAUX, S.; NONGONIERMA, A. B.; BARRE, C.; FITZGERALD, R. J. Enzymatic generation of whey protein hydrolysates under pH-controlled and non pH-controlled conditions: Impact on physicochemical and bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 199, p. 246-251, 2016.

LIU, C.; WU, X. Optimization of operation parameters in ultrafiltration process. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 195–202, 1998.

MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. **Journal of food Science**, v. 55, n. 2, p. 381-385, 1990.

MORENO, M. C. M.; CUADRADO, V. F. Enzymic Hydrolysis of vegetables proteins: mechanism and kinetics. **Process Biochemistry**, v. 28, p. 481-490, 1993.

NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. The scientific evidence for the role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: A Review. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 640-656, 2015.

ÖNAY-UÇAR, E.; ARDA, N.; PEKMEZ, M.; YILMAZ, A. M.; BÖKE-SARIKAHYA, N.; KIRMIZIGÜL, S.; YALÇIN, A. S. Comparison of antioxidant capacity, protein profile and carbohydrate content of whey protein fractions. **Food Chemistry**, v. 150, p. 34-40, 2014.

PENG, X.; XIONG, Y. L.; KONG, B. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. **Food Chemistry**, v. 113, p. 196-201. 2009.

PESSATO, T. B.; CARVALHO, N. C.; TAVANOB, O. L.; FERNANDES, L. G.; ZOLLNER, R. L.; NETTO, F. M. Whey protein isolate hydrolysates obtained with free and immobilized Alcalase: Characterization and detection of residual allergens. **Food Research International**, v. 83, p. 112-120, 2016.

PEREA, A.; UGALDE, U.; RODRIGUEZ, I.; SERRA, J.L. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: applications in industrial whey bioconversion processes. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 15, p. 418-423, 1993.

PEREA, A.; UGALDE, U. Continuous hydrolysis of whey proteins in a membrane recycle reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 18, p. 29-34, 1996.

PHELAN, M.; AHERNE, A.; FITZGERALD, R. J.; O'BRIEN, N. M. Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. **International Dairy Journal**, n. 11, v. 19, p. 643-54, 2009.

PRIETO, C. A.; GUADIX, A.; GONZÁLEZ-TELLO, P.; GUADIX, E. M. A cyclic batch membrane reactor for the hydrolysis of whey protein. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 257–265, 2007.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

SAHA, B. C., HAYASHI, K. Debittering of protein hydrolyzates. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 355–370, 2001.

SARMADIA, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, v. 31, p. 1949-1956, 2010.

SILVA, M. C.; SILVA, V. D. M.; LANA, A. M.; SILVESTRE, M. P. C. Grau de hidrólise e perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos obtidos a partir de concentrado proteico do soro de leite. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 3, p. 395-402, 2009.

SUJITH, P. A.; HYMAVATHI, T.V. Recent developments with debittering of protein hydrolysates. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, v. 4, p. 365-381, 2011.

SPELLMAN, D.; O'CUINN, G; FITZGERALD, R.J. Bitterness in *Bacillus* proteinase hydrolysates of whey proteins. **Food Chemistry**, v. 114, p. 440-446, 2009.

TAVARES, T. G.; AMORIM, M.; GOMES, D.; PINTADO, M. E.; PEREIRA, C. D.; MALCATA, F. X. Manufacture of bioactive peptide-rich concentrates from Whey: Characterization of pilot process. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 547-552, 2012.