

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

Sandrini Slongo Fortuna

**Hidrólise e separação de peptídeos de *buttermilk* obtidos a partir de um
biorreator a membrana**

Passo Fundo

2020

Sandrini Slongo Fortuna
Engenheira de Alimentos

**Hidrólise e separação de peptídeos de *buttermilk* obtidos a partir de um
biorreator a membrana**

Dissertação de Mestrado apresentada para
obtenção do título de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos
Orientador: Vandrê Barbosa Brião
Linha de pesquisa: Processos biotecnológicos
e não convencionais na produção de alimentos
e ingredientes.

Passo Fundo
2020

**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

**Hidrólise e separação de peptídeos de *buttermilk* obtidos a partir de um
biorreator a membrana**

Elaborada por
Sandrini Slongo Fortuna

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

Comissão Examinadora



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



Christian Oliveira Reinehr, Dr., UPF



Maria Beatriz Abreu Glória, Dra., UFMG

**Passo Fundo, RS, Brasil
2020**

CIP – Catalogação na Publicação

F745h Fortuna, Sandrini Slongo
Hidrólise e separação de peptídeos de *buttermilk*
obtidos a partir de um biorreator a membrana [recurso
eletrônico] / Sandrini Slongo Fortuna. – 2020.
2.1 MB ; PDF.

Orientador: Prof. Dr. Vandré Barbosa Brião.
Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de
Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2020.

1. Buttermilk. 2. Peptídeos. 3. Proteínas. 4. Filtração
por membranas. I. Brião, Vandré Barbosa, orientador.
II. Título.

CDU: 637.1

Catalogação: Bibliotecária Juliana Langaro Silveira - CRB 10/2427

Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha mãe Marizete e à minha nona, Ofélia, que sempre demonstraram amor e preocupação, aos meus irmãos e ao meu namorado Douglas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela certeza do amparo, por me apresentar pessoas impulsionadoras, me guiar e me fazer compreender o que precisava ser compreendido.

À minha família, pela preocupação, cobrança, segurança e carinho. Pelas ligações diárias e por todo afeto. Nona, mãe, pai, Leh, Talia e Kaíke, obrigada! Eu amo vocês. E Letícia, obrigada por todos os conselhos e pela amizade, com certeza me ajudaram muito por todo esse tempo.

À CAPES pela bolsa concedida, tornando possível a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Vandré, pela orientação, preocupação, cobrança, conselhos e o frequente contato. Com certeza és um exemplo a ser seguido. Obrigada por acreditar em mim.

À professora Luciane Colla, por me aconselhar, não sendo apenas a professora que admiro, mas também a amiga que pretendo levar para a vida.

Aos funcionários da Engenharia de Alimentos, Lisiane, Mara, Marilda, Nara e Márcia, mas em especial ao João Barcelos, por me aguentar no laboratório com minhas bagunças.

À professora Luciane Ruschel, por me auxiliar em uma análise quase impossível, principalmente cedendo uma excelente aluna, Lara Spagnol, sua bolsista, em auxílio nos testes. Obrigada de todo coração pela ajuda.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, aos professores do programa e à secretária Dani, muito obrigada.

Ao Luan Felipe, mais que um colega de pós-graduação, um amigo. A pessoa que me ensinou tanto sobre peptídeos e sobre a vida, obrigada!

À Fernanda, minha amiga/irmã, minha inspiração, que mesmo tão longe sempre se faz presente e busca me incentivar e me impulsionar. Sinto sua falta, obrigada por tudo!

À Natani, Juliana, Zaira, Vanessa, Bárbara e Talita, por me ajudarem em tantos momentos, e multiplicarem os melhores momentos com muita alegria.

Ao Guilherme, por mesmo de cara fechada ter sido uma boa companhia durante todos esses anos. Espero que seu humor melhore ao longo do tempo, viu! Obrigada por tudo.

Ao meu namorado Douglas, por ter sido tanto, por tanto tempo. Por não me deixar desistir, por me incentivar e segurar minha mão quando as coisas estavam ruins. Eu devo muito a você. E te agradeço por acrescentar à minha vida, a sua família, que sinto também ser minha. Inclusive, obrigada pela melhor cunhada que eu poderia ter. Eu amo vocês!

À todos aqueles que contribuíram, o meu mais sincero muito obrigada.

A vida nem sempre é como sonhamos, mas
nem sempre sonhamos o que queremos viver.

- Allan Kardec

RESUMO

Do processo que culmina a produção da manteiga a partir do creme de leite, libera-se o soro de manteiga, *buttermik*, considerado também como subproduto e até mesmo um resíduo industrial, por não apresentar reaproveitamento adequado. Este subproduto contém componentes do creme solúveis em água, como proteínas, lactose e minerais. Particularmente as proteínas quando reduzidas a peptídeos por hidrólise enzimática, apresentam atividade biológica. Este trabalho visou obter peptídeos de baixo peso molecular a partir do *buttermik* através de um processo combinado de hidrólise enzimática e filtração com membranas. O *buttermilk* foi centrifugado e caracterizado quanto à gordura, proteína, lactose, caseína, sólidos totais e pH, após, foi submetido à hidrólise com diferentes enzimas comerciais. A melhor enzima foi selecionada e submetida ao biorreator à membrana. Amostras selecionadas foram liofilizadas. Visando a caracterização dos peptídeos formados após esta etapa, análises do cálculo do comprimento médio da cadeia e da massa molecular média dos peptídeos e eletroforese em gel, foram realizadas. Para avaliação da bioatividade, realizaram-se análises da atividade antimicrobiana e antioxidante. As enzimas apresentaram diferentes graus de hidrólise (GH), onde a Alcalase (endopeptidase) e a Neutrase (exopeptidase) quando utilizadas em sequência, apresentaram melhor ação chegando a um GH de 34 %. O processo de centrifugação foi eliminado mostrando não haver variações no fluxo com ou sem sua aplicação. Foram encontrados valores de rejeição $R = 87,55\%$ para o ensaio não utilizando o processo de hidrólise, e $R = 60,25\%$ para o ensaio utilizando o processo de hidrólise, comprovando que a hidrólise possibilitou maior passagem de proteína para o permeado, indicando eficiência do processo. As amostras hidrolisadas apresentaram bioatividade, com destaque para o permeado obtido pela filtração por membranas e concentrado por liofilização que apresentou maior atividade antioxidante. Foi possível aliar a obtenção de um hidrolisado proteico, comprovando sua bioatividade, com o reaproveitamento de um subproduto pouco valorizado na indústria de alimentos.

Palavras-chave: proteína, bioatividade, filtração por membranas.

ABSTRACT

From the process that culminates the production of butter from the cream, buttermilk, buttermik, is also released, also considered as a by-product and even an industrial residue, as it does not present adequate reuse. This by-product contains water-soluble components of the cream, such as proteins, lactose and minerals. Particularly proteins, when reduced to peptides by enzymatic hydrolysis, have biological activity. This work aimed to obtain low molecular weight peptides from buttermik through a combined process of enzymatic hydrolysis and membrane filtration. The buttermilk was centrifuged and characterized for fat, protein, lactose, casein, total solids and pH, afterwards, it was subjected to hydrolysis with different commercial enzymes. The best enzyme was selected and submitted to the membrane bioreactor. Selected samples were lyophilized. In order to characterize the peptides formed after this step, analyzes of the calculation of the average chain length and the average molecular weight of the peptides and gel electrophoresis were performed. To assess bioactivity, analyzes of antimicrobial and antioxidant activity were performed. The enzymes showed different degrees of hydrolysis (GH), where Alcalase (endopeptidase) and Neutrase (exopeptidase) when used in sequence, showed better action reaching a GH of 34%. The centrifugation process was eliminated showing that there are no variations in the flow with or without its application. Rejection values were found $R = 87.55\%$ for the assay not using the hydrolysis process, and $R = 60.25\%$ for the assay using the hydrolysis process, proving that the hydrolysis made it possible for more protein to pass through the permeate, indicating process efficiency. The hydrolyzed samples showed bioactivity, with emphasis on the permeate obtained by membrane filtration and concentrate by lyophilization, which showed greater antioxidant activity. It was possible to combine the obtaining of a protein hydrolyzate, proving its bioactivity, with the reuse of a by-product little valued in the food industry.

Keywords: proteins, bioactivity, membrane filtration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1: Representação das diferentes etapas na fabricação de manteiga. | 27 |
| Figura 2: Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica, catalisada por uma enzima proteolítica..... | 40 |
| Figura 3: Mecanismo de ação das subtilisinas | 42 |
| Figura 4: Características de processos que utilizam diferença de pressão como força motriz. | 46 |
| Figura 5: Fluxograma geral dos processos utilizados neste trabalho. | 51 |
| Figura 6: Esquema do Biorreator utilizado para a hidrólise proteica do buttermilk e separação dos peptídeos | 53 |
| Figura 7: Avaliação do fluxo de permeado com e sem o processo de centrifugação | 62 |
| Figura 8: Avanço do grau de hidrólise das proteínas do <i>buttermilk</i> e mmols de base consumida utilizando a enzima Alcalase® 2.4L | 63 |
| Figura 9: Avanço do grau de hidrólise das proteínas do <i>buttermilk</i> e mmols de base consumida utilizando a enzima Prolyve | 65 |
| Figura 10: Avanço do grau de hidrólise das proteínas do <i>buttermilk</i> e mmols de base consumida utilizando a enzima Neutrase | 66 |
| Figura 11: Avanço do grau de hidrólise das proteínas do <i>buttermilk</i> utilizando Lypaine e mmols de base consumida | 67 |
| Figura 12: Grau de hidrólise sequencial das proteínas do buttermilk utilizando a Alcalase seguida de Neutrase..... | 68 |
| Figura 13: Fluxo de permeado durante a filtração do <i>buttermilk</i> com membrana de ultrafiltração à temperatura de 50°C e pressão de 1bar | 69 |
| Figura 14: Fluxo de permeado durante a filtração do <i>buttermilk</i> hidrolisado com Alcalse + Neutrase com membrana de ultrafiltração à temperatura de 50°C e pressão de 1bar | 71 |
| Figura 15: Perfil eletroforético das amostras em gel Tris-Tricina..... | 77 |
| Figura 16: Análise antimicrobiana com a cepa de <i>E. coli</i> | 82 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Caracterização do <i>buttermilk</i> | 28 |
| Tabela 2: Concentração das proteínas do <i>buttermilk</i> , massa molar e sequência de aminoácidos..... | 29 |
| Tabela 3: Enzimas, condições e inativação de hidrólise utilizadas..... | 52 |
| Tabela 4: Caracterização do <i>buttermilk</i> | 61 |
| Tabela 5: Comparação das composições da corrente de permeado antes e após o processo de hidrólise enzimática..... | 72 |
| Tabela 6: Comparação das composições da corrente de retido antes e após o processo de hidrólise enzimática..... | 72 |
| Tabela 7: Caracterização molecular do hidrolisado obtido com Alcalase e Neutrase..... | 75 |
| Tabela 8: Atividade antioxidante das amostras expressa por $\mu\text{mol TE/g}$ de proteína e % de inibição..... | 79 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1: Substratos e suas bioatividades | 32 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA – Atividade Antioxidante

BAL – Bactéria ácido láctea

BRM – Biorreatores à membrana

BHA – Hidroxianisol butilado

BHT – Hidroxitolueno butilado

CMC - Comprimento médio da cadeia

LF - Derivado de lactoferina

ECA - Enzima conversora de angiotensina

FTIR - Espectroscopia no infravermelho próximo

FP - Fluxo de permeado

PLs - Fosfolipídeos

GH - Grau de hidrólise

CMP - Lactoferrina e caseinomacropéptido

MMM - Massa molecular média

MFGM - Membrana do glóbulo da gordura do leite

MF - Microfiltração

NF - Nanofiltração

OI - Osmose inversa

PA - Pressão arterial

PSM - Processo de separação por membranas

R - Rejeição

UF - Ultrafiltração

UPF – Universidade de Passo Fundo

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 25 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 27 |
| 2.1 BUTTERMILK..... | 27 |
| 2.2 PEPTÍDEOS BIOATIVOS E BIOATIVIDADES | 29 |
| 2.2.1 Atividade antimicrobiana | 32 |
| 2.2.2 Atividade antioxidante | 35 |
| 2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA | 37 |
| 2.3.1 Endopeptidases..... | 41 |
| 2.3.2 Exopeptidases..... | 43 |
| 2.4 BIORREADORES PARA BUTTERMILK | 44 |
| 2.5 ULTRAFILTRAÇÃO DOS HIDROLISADOS PROTEICOS | 45 |
| 2.5.1 Seletividade da membrana | 48 |
| 2.5.2 Fluxo e permeabilidade | 49 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 51 |
| 3.1 BUTTERMILK..... | 52 |
| 3.2 CENTRIFUGAÇÃO DO <i>BUTTERMILK</i>..... | 52 |
| 3.3 HIDRÓLISE PROTEICA..... | 52 |
| 3.4 OPERAÇÃO DO BIORREATOR..... | 53 |
| 3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS..... | 55 |
| 3.5.1 Caracterização físico-química | 55 |
| 3.5.2 Grau de hidrólise | 55 |
| 3.5.3 Caracterização dos peptídeos | 56 |
| 3.5.3.1 <i>Cálculo do comprimento médio da cadeia e da massa molecular média dos peptídeos.....</i> | <i>56</i> |
| 3.5.3.2 <i>Eletroforese em gel.....</i> | <i>57</i> |
| 3.5.4 Atividade antimicrobiana dos peptídeos | 57 |
| 3.5.5 Atividade antioxidante dos peptídeos | 58 |
| 3.5.6 Análise estatística dos resultados | 59 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 61 |
| 4.1 CARACTERIZAÇÃO E CENTRIFUGAÇÃO DO <i>BUTTERMILK</i>..... | 61 |
| 4.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO BUTTERMILK | 62 |
| 4.3 PRODUÇÃO DOS PEPTÍDEOS NO BIORREATOR A MEMBRANA..... | 69 |

| | |
|---|------------|
| 4.3.1 Avaliação do processo | 72 |
| 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS | 74 |
| 4.4.1 Comprimento médio da cadeia e da massa molecular média | 74 |
| 4.4.2 ELETROFORESE | 77 |
| 4.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS HIDROLISADOS PROTEICOS PRODUZIDOS | 78 |
| 4.5.1 Atividade antioxidante | 79 |
| 4.5.2 Atividade antimicrobiana | 81 |
| 5 CONCLUSÃO | 85 |
| REFERÊNCIAS | 86 |
| APÊNDICE A: PROCEDIMENTO DE LIMPEZA DA MEMBRANA ... | 106 |
| APÊNDICE B: FLUXO DE PERMEADO PARA A ÁGUA E PARA A SOLUÇÃO PROTEICA | 107 |
| APÊNDICE C: CÁLCULO DA CADEIA MÉDIA DOS PEPTÍDEOS COM HIDRÓLISE DE DIFERENTES ENZIMAS | 108 |
| APÊNDICE D: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EXPRESSA EM MMOL TE/G E EM % DE INIBIÇÃO PARA AS AMOSTRAS LIOFILIZADAS..... | 110 |
| APÊNDICE E: ARTIGO CIENTÍFICO | 111 |

1 INTRODUÇÃO

No processo de produção de manteiga, durante o batimento, libera-se o soro (*buttermilk*). Segundo O'connell e Fox (2018), a produção mundial de *buttermilk* é de $6,5 \times 10^6$ toneladas anuais, sendo um importante candidato à conquista de nicho de mercado. Considerado um resíduo industrial, ou sendo muitas vezes utilizado como alimento animal, é um subproduto complexo, e contém proteínas, lipídeos, oligossacarídeos, fosfolipídios, glicolipídeos, glicoproteínas e muitos componentes com atividades biológicas. Particularmente as proteínas, quando reduzidas à peptídeos, apresentam grande capacidade biológica (ASTAIRE et al., 2003).

Os aspectos funcionais e nutricionais do *buttermilk* devem ser ressaltados, pois se sabe que os peptídeos são mais facilmente digeríveis do que a proteína intacta e cumprem funções nutritivas e farmacológicas.

As proteínas presentes no *buttermilk* são fontes de peptídeos biologicamente ativos, podendo apresentar, por exemplo, atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. Essas proteínas, em geral, têm peptídeos criptografados na sua estrutura que por processo de digestão são liberados, absorvidos e transportados para os órgãos, atuando em diversas vias metabólicas específicas e fornecendo diversos benefícios à saúde. Porém, enquanto os peptídeos estiverem presos na sequência original da proteína, eles possuem baixa atividade biológica. Além disso, proteínas com estrutura globular compacta podem causar alergia, pois as enzimas do sistema digestivo não chegam até os sítios de clivagem não ocorrendo a digestão. A hidrólise enzimática libera os peptídeos e diminui a alergenicidade por expor as cadeias, facilitando a sua digestão.

O grau de hidrólise e a massa molecular dos peptídeos obtidos no processo de hidrólise estão diretamente relacionados 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. Diversas proteases podem ser utilizadas para esse fim. Esse trabalho estudou diferentes enzimas (endoproteases e exoproteases), buscando selecionar ou combinar enzimas para um melhor grau de hidrólise. No entanto, além da clivagem, é necessário também fazer a separação dos peptídeos produzidos.

Os biorreatores à membrana (BRM) permitem operar processos que compreendem etapas de transformação e separação. São constituídos de um tanque onde há transformação química dos reagentes, no qual uma membrana com tamanho de poro adequado faz a separação do produto. Há diversos trabalhos envolvendo o uso de BRM para a produção de

peptídeos, usando como carga proteica soro de leite, (VERDI, 2017) leite, (ARAUS, 2011), resíduos cárneos (ZUBILLAGA, 1984) e outros. O *buttermilk* pode ser submetido ao BRM para hidrólise e separação, combinando a transformação e separação dos peptídeos, tendendo a diminuir os custos e dar agilidade ao processo produtivo. Uma das maiores vantagens é que esta configuração permite o controle do peso molecular dos produtos selecionando adequadamente o poro da membrana (CHEISON et al., 2006; PRIETO et al., 2007). No entanto, o *buttermilk* possui em sua composição gordura (fosfolipídeos e outros), que também é retida podendo causar incrustação da membrana, dificultando a seletividade e o desenvolvimento de subprodutos com aplicação industrial. Esse trabalho testou também o efeito da gordura do *buttermilk* no fluxo do permeado, avaliando se essa poderia prejudicar o processo de separação dos peptídeos produzidos.

A utilização do *buttermilk* em ações combinadas de hidrólise enzimática e separação por membranas, utilizando um biorreator, permite utilizar esse resíduo como matéria prima para produção de peptídeos com atividade biológica.

Calvo et al. (2020), estudaram a caracterização de lipídeos neutros e polares de *buttermilk* de diferentes fontes e seus isolados da membrana do glóbulo de gordura do leite (MFGM). Jahkar et. al., (2019) estudaram o desenvolvimento de sucos de frutas a partir do *buttermilk* e a avaliação de suas qualidades nutricionais. SPITSBERG et al. (2019) estudaram a recuperação da MFGM do *buttermilk* avaliando o efeito de sais e de ligação de cálcio. Barry et al. (2017), estudaram a obtenção de fosfolipídeos do *buttermilk* através da hidrólise enzimática e filtração por membranas. Costa (2008) estudou a obtenção de um ingrediente lácteo enriquecido em lipídeos polares a partir do *buttermilk*. Muitos desses trabalhos apresentam algo em comum, o estudo da fração lipídica do *buttermilk*. Encontra-se uma extensa bibliografia sobre esse tema, em contrapartida, poucos trabalhos científicos abordam o uso de sua carga proteica para a produção de peptídeos.

A obtenção de um subproduto lácteo enriquecido com peptídeos com propriedades biológicas específicas e potencialmente benéficas à saúde visou o aproveitamento de um resíduo da indústria de alimentos, utilizando processos biotecnológicos e não convencionais, buscando o desenvolvimento de produtos de alto valor agregado e apresentando um conceito prático quanto ao processo de obtenção que combina hidrólise e separação.

Objetivou-se assim avaliar se a produção de peptídeos a partir do *buttermilk* em um BRM é uma alternativa para seu aproveitamento, estudando a hidrólise, separação e bioatividade, designando suas aplicações e obtendo subprodutos de alto valor agregado.

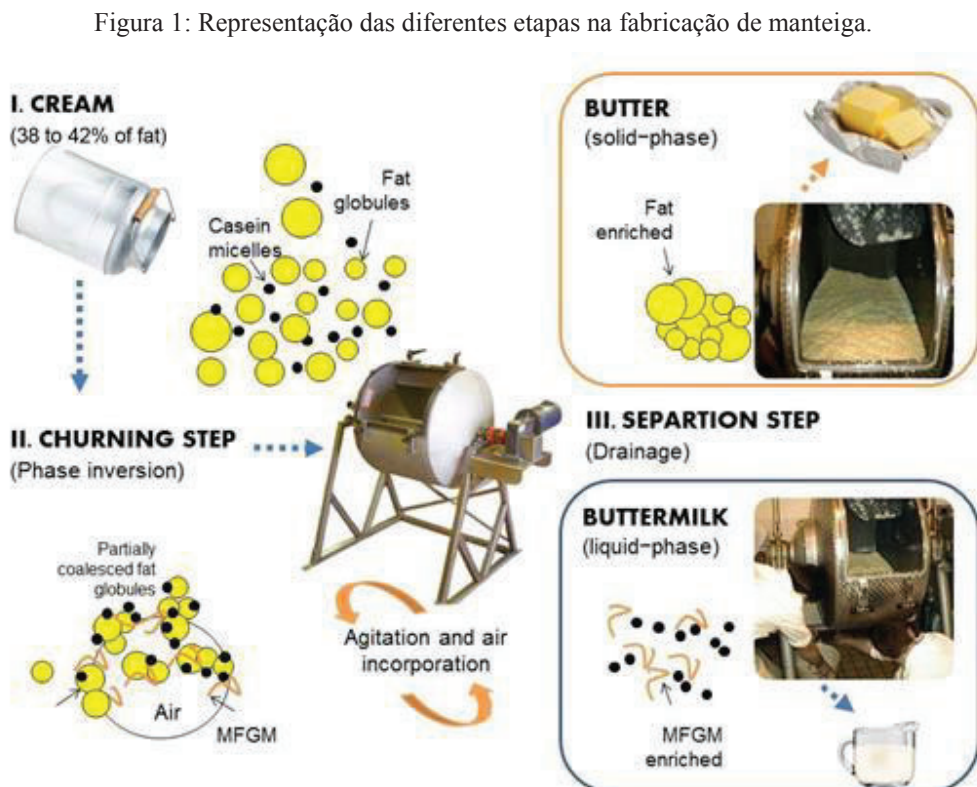
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BUTTERMILK

O *buttermilk* é um subproduto liberado durante a agitação do creme no processo de fabricação da manteiga. É uma fase líquida que contém água e componentes solúveis do creme. Sua composição é muito semelhante à do leite desnatado, e o *buttermilk* contém lactose, proteínas (caseína e proteínas séricas) e minerais (DE BASSI et al., 2011).

A Figura 1 demonstra a representação esquemática das diferentes etapas de processamento utilizadas na fabricação de manteiga, com seu impacto na estrutura da matriz do leite.

(I) Creme pasteurizado é agitado para induzir uma inversão de fase; (II) MFGM é rompida; (III) o líquido expelido (*buttermilk*) resultante da agitação é drenado, e os grãos de manteiga são processados.



Fonte: CONWAY; GAUTHIER; POULIOT (2014).

A caracterização do *buttermilk* está descrita na tabela 1.

Tabela 1: Caracterização do *buttermilk*

| Determinações | Gordura (%) | Proteína (%) | Lactose (%) | Sólidos Totais (%) |
|---------------|-------------|--------------|-------------|--------------------|
| | 1,30±0,01 | 3,42±0,12 | 3,60±0,04 | 9,57±0,21 |

Fonte: HEBATALLAH et. al., 2018

A agitação do creme durante o processo de fabricação da manteiga rompe a camada emulsificante natural do glóbulo de gordura do leite e libera fragmentos da MFGM, lipídeos polares e proteínas de membrana na fase aquosa (soro) que caracteriza o subproduto *buttermilk* (CORREDIG et al., 2003, MORIN et al, 2007). Os fragmentos MFGM contêm lipídios polares, lipídios neutros, proteínas, glicoproteínas, enzimas e colesterol (FAUQUANT et al. 2014).

O MFGM é uma estrutura delgada (10 a 50 nm), mas também um complexo sistema biofísico que representa 2 a 6 % da massa total do glóbulo de gordura do leite (LOPEZ, 2011). Para cumprir a função de garantir a estabilidade físico-química do leite, o MFGM é composto por uma mistura altamente complexa de proteínas e lipídios polares e não polares, que representam mais de 90 % de sua massa seca (SPITSBERG, 2005). Estes constituintes estão dispostos em uma estrutura de três camadas heterogêneas secretadas pelas células epiteliais das glândulas mamárias de bovinos. O MFGM consiste, principalmente de 1) uma única camada interna de lipídios polares, 2) um revestimento de proteína densa, e 3) uma camada externa de lipídios polares e proteínas específicas incorporadas (VANDERGHM et al., 2010).

Cerca de 20 % das proteínas do *buttermilk* são de origem MFGM. Estas proteínas são solubilizadas durante a agitação. De fato, qualquer tratamento que cause ruptura ou quebra da MFGM afetará a distribuição dos componentes menores de origem láctea na matriz final. Os resíduos de MFGM no *buttermilk* são responsáveis pelas propriedades nutricionais e tecnológicas exclusivas deste coproduto lácteo (CONTARINI; POVOLO, 2013).

Quantitativamente, estima-se que a produção de *buttermilk* seja semelhante à da manteiga, que foi relatada como sendo de aproximadamente 5,2 milhões de toneladas em todo o mundo em 2013 (FAOSTAT, 2015). O *buttermilk* é distinguível pelo seu teor de gordura marginalmente superior, 2,80 % em comparação com 0,74 % em leite desnatado (BARRY et al., 2016), decorrente da desestabilização dos glóbulos de gordura do leite e da liberação de lipídios polares (BRITTEN et al., 2008 ; SODINI et al., 2006). A concentração desses lipídios

polares, fosfolipídios (PLs), tem sido relatada como sendo até 15 vezes maior que a do leite integral.

Anteriormente considerado um subproduto de baixo valor da fabricação de manteiga, o *buttermilk* pode ser utilizado na indústria de alimentos e bebidas devido à natureza anfifílica inerente de seus fosfolipídeos com sua cauda hidrofóbica e grupo hidrofílico: (CONTARINI POVOLO, 2013, DEWETTINCK et al., 2008) que é o principal responsável pelas propriedades funcionais e tecnológicas do *buttermilk*, tais como emulsificação e estabilização (CORREDIG DALGLEISH, 1997 , FERREIRO et al., 2016 , KUCHTA et al., 2012).

Os processos de separação por membranas foram explorados por vários grupos no decurso do enriquecimento da concentração do material MFGM no *buttermilk*. A microfiltração, devido à sua seletividade, tem sido extensivamente pesquisada (HOLZMÜLLER KULOZIK, 2016).

O *buttermilk*, sendo um importante componente multifuncional pode ser recomendado como antioxidante natural, capaz de prevenir, por exemplo, o processo de oxidação. Segundo Conway et al. (2012) as proteínas do *buttermilk* tinham maior potencial de eliminação de radicais livres do que proteínas do leite desnatado ou proteínas de soro de leite.

2.2 PEPTÍDEOS BIOATIVOS E BIOATIVIDADES

As frações e o peso molecular das proteínas presentes no *buttermilk* estão dispostas na Tabela 2.

Tabela 2: Concentração das proteínas do *buttermilk*, massa molar e sequência de aminoácidos.

| Proteína | % | Peso Molecular (kDa) | Sequência de aminoácidos |
|-------------------------|---------|----------------------|--------------------------|
| α 1-Caseína | 12-32 | 23 | 199 |
| α 2-Caseína | 6-12 | 25 | 207 |
| β -Caseína | 11-31 | 24 | 209 |
| κ -Caseína | 7-13 | 19 | 169 |
| β -Lactoglobulina | 22-39 | 18,3 | 162 |
| α -Lactoalbumina | 11-20 | 14,2 | 123 |
| Proteínas MFGM | 0,5-0,9 | 60 a 150 | 700 |

Legenda: MFGM: Membrana do glóbulo da gordura do leite

Fonte: Adaptado de CATHERINE et. al. (2016) e BARBARA et. al. (2016).

A bioatividade das proteínas depende da sequência dos aminoácidos. Normalmente os peptídeos podem ser compostos de 2 a 20 aminoácidos e são classificados de acordo com o tamanho. Consideram-se curtos aqueles que possuem menos de 7 aminoácidos, peptídeos de

comprimento moderado 7 a 25 aminoácidos e peptídeos grandes, que possuem mais de 25 aminoácidos (PANCHAUD; AFFOLTER; KUSSMAN, 2012).

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 de antienvhecimento (BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015).

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 peptídeos tem despertado crescente interesse científico e comercial, 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 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, suplementação dietética de idosos, nutrição de esportistas, entre outros (AFONSO, 2008).

Dentre as funções biológicas dos peptídeos descritas na literatura, destacam-se os efeitos: anti-hipertensivo, antibacteriano, antiviral, antiglicemiante antitrombóticos, imunomoduladora, opióide e atividade antioxidante (LI et al., 2019; IWANIAK, DAREWICZ, MINKIEWICZ, 2018).

A bioatividade das proteínas do leite pode ser devida à proteína intacta ou a peptídeos criptografados na molécula. Algumas bioatividades aparecem apenas se as proteínas são hidrolisadas usando enzimas diferentes (RIPOLLÉS et al., 2015). A bioatividade depende da composição de aminoácidos, sequência e massa molecular, que também são afetados por condições de processamento (ALEMÁN et al., 2011). Vários estudos confirmaram que peptídeos liberados de hidrolisados de proteínas do leite têm atividade antioxidante (NONGONIERMA E FITZGERALD, 2013; O'KEEFFE E FITZGERALD, 2014).

A proteólise de proteínas alimentares pode produzir alguns peptídeos com atividade anti-hipertensiva, podendo ser utilizado também como inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), uma enzima chave envolvida na regulação da pressão sanguínea (ARIYOSHI 1993; JANITHA et al. 2002; MEISEL 1997; ROBERT et al. 2004; YAMAMOTO 1997) ou antioxidantes (NAQASH E NAZEER 2011; SUN et al. 2011). As proteínas do leite são boas fontes inibidoras da ECA e vêm sendo amplamente estudadas (DA COSTA et al. 2007; LÓPEZ-FANDIÑO et al. 2006; MIGUEL et al. 2009; ORTIZ-CHAO et al. 2009).

A produção e o progresso de alimentos funcionais à base de leite para o controle da Pressão Arterial (PA) vem ganhando grande atenção. Os peptídeos de leite demonstraram sua capacidade de atingir uma PA mais baixa em sete ensaios clínicos gerais (XU et al. 2008; CICERO et al. 2011).

Estudos apontam que o desenvolvimento de alimentos funcionais à base de subprodutos de leite para o controle da PA tem sido de grande interesse nos últimos anos. Peptídeos lácteos foram utilizados para diminuir a PA em muitos ensaios clínicos. Os resíduos de aminoácidos foram direcionados para o desenvolvimento de alimentos funcionais inibindo a ECA. Os componentes da MFGM, encontrados no *buttermilk*, têm tido um interesse crescente nos últimos anos devido às suas propriedades nutricionais únicas e seu potencial anti hipertensivo. Estudos apontaram que uma dieta à curto prazo com *buttermilk*, através de seu alto conteúdo de MFGM e seu efeito sobre o sistema ECA - diminui a PA em indivíduos normotensos. Esses dados indicam que o *buttermilk* pode representar uma nova modalidade alimentar segura para controlar o colesterol sanguíneo e a PA como parte da alimentação saudável. (CONWAY et al., 2014). Peptídeos de *buttermilk* com aminoácidos específicos e resíduos hidrofóbicos foram aplicados para inibição da ECA (DEWETTINCK et al. 2008). Tanto caseínas principais como as principais proteínas de soro de leite, mas também algumas proteínas menores no leite contêm sequências capazes de inibir a ECA. Digestões tripéticas de caseínas demonstraram ser boas fontes de peptídeos inibidores de ECA (MULLALLY et al. 1997; MEISEL, 1998; PIHLANTO-LEPPÄLÄ et al. 1998 e 2000; KIM et al. 1999; TAUZIN et al. 2002; FUGLSANG et al. 2003).

Investigações *in vitro* revelaram que o *buttermilk* possui a capacidade de inibir a solubilidade micelar do colesterol, que foi possivelmente atribuída à existência de lipídios polares no MFGM. A maioria dos estudos até o momento se concentrou em PLs purificados do MFGM, negligenciando a complexa mistura MFGM de lipídios polares e proteínas bioativas. O efeito do *buttermilk* nas concentrações de colesterol plasmático em humanos,

com preocupações com o mecanismo fundamental, requer uma investigação mais aprofundada (CONWAY et al. 2010).

Algumas bioatividades estão demonstradas também no quadro a baixo.

Quadro 1: Substratos e suas bioatividades

| Substrato | Enzima | Atividade | Referência |
|---|--|--|---------------------------------|
| β -lactoglobulina | Corolase® PP | Inibição da ECA | O'KEEFFE et al., (2017) |
| α -lactalbumina β -lactoglobulina | Protease da flor de <i>Cynara</i> <i>cardunculus</i> | Inibição da ECA | TAVARES et al., (2011) |
| Lactoferrina B α | Digestão simulada | Anti-hipertensivo | FERNANDZ-MUSOLES et al., (2013) |
| β -lactoglobulina | Termo-lisina | Inibição da ECA Antioxidante | DEL MAR et al., (2011) |
| κ -Caseína | Alcalase® 2.4L | Antioxidante | CHENG;XIONG; KONG, 2009 |
| Lactoferrina | Tripsina | Proliferação de osteoblastos | SHI et al., 2018 |
| α -lactalbumina | Pepsina | Antibacteriano principalmente gram (-) | THEOLIER et al (2013) |
| β -lactoglobulina | Pepsina | Antibacteriano | THEOLIER et al (2013) |

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

2.2.1 Atividade antimicrobiana

Laticínios são fontes de peptídeos antimicrobianos (SIBEL AKALIN, 2014; THÉOLIER, 2014), peptídeos específicos foram identificados a partir de hidrolisados das proteínas caseína (LAHOV e REGELSON, 1996), lactoglobulina (PELLEGRINI et al. 2001), lactalbumina (PELLEGRINI et al. 1999) e lactoferrina (BELLAMY et al. 1992).

Os peptídeos antimicrobianos podem ter diversas sequências de aminoácidos, embora grande parte tenham certa semelhança de aminoácidos, carga líquida e hidrofobicidade

(AKALIN, 2014). Além disso, a maioria dos peptídeos antimicrobianos tem de 10 a 50 aminoácidos e características catiônicas e anfipáticas (MADUREIRA et al., 2010; THÉOLER et al., 2014). Segundo Mohanty et al. (2016) os peptídeos antimicrobianos podem ter um comprimento de até 100 aminoácidos com caráter anfipático, possuindo uma carga líquida positiva de $+2$ a $+9$ e existindo em formas catiônicas ou aniônicas.

A maioria dos peptídeos antimicrobianos são codificados por genes e sintetizados nos ribossomos, embora existam outros resultados de efeitos colaterais de metabólitos (por exemplo, lactoferrina). A atividade antimicrobiana peptídica é ampla. Pode-se encontrar atividade antiviral, antifúngica, antibacteriana e, até, em alguns casos, antitumoral. Seus mecanismos de ação são múltiplos e incluem interações de membrana celular, inibição da síntese proteica e de ácidos nucleicos, com funções imunomoduladoras e quimiotáticas (YANG et al., 2004; HALE et al., 2007).

A maioria dos peptídeos antimicrobianos são catiônicos, o que significa que eles têm uma carga positiva em pH fisiológico, devido ao alto teor de arginina e lisina. Esse fator catiônico pode ser reforçado por uma amidação na ligação terminal C. Os peptídeos antimicrobianos adotam estruturas anfipáticas e hidrofóbicas (HANCOCK et al., 2006).

Peptídeos antimicrobianos podem ter ação terapêutica através de várias estratégias: em monoterapia, para o tratamento de infecções, em combinação com antibióticos convencionais, a fim de promover um efeito sinérgico; como agentes imunomoduladores aumentando a imunidade natural e como agentes neutralizantes de toxinas, a fim de prevenir complicações e fatalidades associadas a fatores de virulência que causam choque séptico (GORDON et al., 2005).

As bactérias ácido lácticas (BAL) constituem um grupo de microrganismos amplamente distribuídos nos alimentos, produtoras de uma variedade de compostos antimicrobianos, incluindo: toxinas, enzimas bacteriolíticas, subprodutos de via metabólica (ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio) e bacteriocinas (DE VRESE et al., 2001; ISOLAURI et al., 2001; JACKSON et al., 2002; HILDE et al., 2003; KHEDID et al., 2009).

As BAL são importantes na conservação de alimentos devido à sua capacidade de interferir na multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas, por meio de vários mecanismos, como a produção de substâncias antagonistas, estas que são responsáveis pelo sabor ácido do *buttermilk* (ADAMS & NICOLAIDES, 1997).

A atividade antimicrobiana das BAL tem sido relatada por diversos autores (ALEXANDRE et al., 2002; O'SULLIVAN et al., 2002; FRIEDMAN et al., 2003; KATHARIOU, 2004; MADIGAN et al., 2004; GUEDES NETO et al., 2005; MAKINO et al.,

2005; PINTADO et al., 2005; RODRÍGUEZ et al., 2005). Estas bactérias possuem um grande potencial de uso como bioconservadores por serem considerados microrganismos seguros para o consumo (ANVISA, 2002). Durante o armazenamento, preservam os alimentos, as características sensoriais e também são capazes de inibir microrganismos indesejáveis, como *Listeria monocytogenes*.

O grupo BAL compreende os gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactospaera*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Veissella*. Diferentes antimicrobianos como ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono e bacteriocinas produzidas por essas bactérias podem inibir microrganismos patogênicos e deteriorantes, prolongando o prazo de validade e aumentando a segurança de produtos alimentares. As bacteriocinas das BAL são consideradas como conservantes naturais seguros ou biopreservativos, pois se supõe que eles são degradados pelas proteases no trato gastrointestinal (FREDERIC et. al., 2004).

Estruturalmente os peptídeos antimicrobianos das BAL podem ser divididos em duas classes principais: peptídeos lineares (KAGAN et. al., 1990) e peptídeos cíclicos com 1 a 3 ligações dissulfeto (GANZ et. al., 1992; NAKAMURA et. al., 1988) Na maioria dos casos, ambas as classes de peptídeos têm características comuns de ser catiônico e anfipático e podem adotar uma estrutura alfa-helicoidal de uma forma hidrofóbica ou formar uma folha beta antiparalela contendo curvas beta.

A lactoferrina é um componente importante dos grânulos específicos de leucócitos polimorfonucleares e exerce seus efeitos antibacterianos por meios de 2 mecanismos: é uma proteína de ligação ao ferro e, portanto, limita a quantidade de ferro livre disponível (OTTO et. al., 1992). A lactoferricina B consiste em 25 resíduos de aminoácidos, considerando que a lactoferricina H é constituída por 47 aminoácidos resíduos ácidos, incluindo uma região homóloga à lactoferricina B. A lactoferricina B é ativa contra uma ampla gama de bactérias negativas e gram-positivas, fungos e protozoários (TURCHANNI et. al., 1995).

Além disso, as BAL podem produzir peptídeos biologicamente ativos, com atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, as bacteriocinas. Estes compostos protéicos podem agir inibindo (efeito bacteriostático) ou destruindo (efeito bactericida) espécies relacionadas (MADIGAN et al., 2004; BROMBERG et al., 2006).

O potencial de aplicação das bacteriocinas como bioconservadores de alimentos requer um conhecimento aprofundado de como elas exercem o seu efeito bactericida. Para muitas bacteriocinas o modo de ação parece ocorrer inicialmente ao nível da membrana

citoplasmática. Tem sido proposto que estes peptídeos formem poros transversalmente à bicamada fosfolipídica, causando a permeabilização da membrana e perda da força protomotora das células sensíveis (KLAENHAMMER, 1993).

2.2.2 Atividade antioxidante

Antioxidantes são substâncias capazes de inibir a oxidação, diminuindo a concentração dos radicais livres no organismo e/ou quelando íons metálicos, prevenindo a peroxidação lipídica (RODRIGUES et al., 2003). Para Barreiros et al., (2006); Halliwell & Gutteridge (1999), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo.

Segundo Siqueira et al. (1997), nutrientes antioxidantes são substâncias que agem nos sistemas biológicos, eliminando os oxidantes ou impedindo a sua transformação em produtos mais tóxicos. A maioria deles é de natureza exógena e precisam ser ingeridos na dieta como antioxidantes em si ou como precursores.

Embora os seres humanos e outros organismos vivos possuem sistemas de defesa antioxidante e de reparação que evoluíram para protegê-los contra os danos oxidativos, esses sistemas não são suficientemente eficazes para impedir totalmente este dano. Contudo, suplementos e substâncias antioxidantes, ou alimentos que contenham antioxidantes, podem ser usados para ajudar a reduzir o dano oxidativo do organismo (YU, 1994).

Os radicais livres gerados em muitos processos redox no corpo são destruídos por enzimas antioxidantes. No entanto, a superprodução de radicais livres reduz o nível das enzimas antioxidantes (WOJTASZEK et. al., 2003). Portanto, antioxidantes são importantes como proteção contra o estresse oxidativo. Os antioxidantes podem atuar em diferentes níveis de sequência oxidativa. Muitos mecanismos pelos quais o estresse oxidativo pode causar danos, por exemplo, ao estimular a reação livre do radical em cadeia da peroxidação lipídica. Reações em cadeia de radicais livres dentro de um material, podem ser inibidos adicionando produtos químicos que retardam a formação de radicais livres (antioxidante preventivo) ou pela introdução de substâncias competitivas pelos radicais existentes visando removê-los do meio de reação (antioxidantes que quebram cadeias) (PARK et al. 2003).

Os antioxidantes naturais têm recebido maior atenção por seus efeitos potenciais na promoção da saúde e prevenção de doenças. A principal ação dos antioxidantes consiste em minimizar os danos celulares exercido pelos radicais livres (RAHMAN, 2007). Alguns

produtos lácteos como leite, leite desnatado, *buttermilk* ou soro de leite e algumas de suas proteínas, lactoferrina, α -lactalbumina, β -lactoglobulina, caseínas ou enzimas endógenas específicas do leite, foram relatados como possuindo propriedades antioxidantes (LINDMARK-MÅNSSON E ÅKESSON, 2000; RIVAL, BOERIU E WICHERS, 2001).

O *buttermilk* e seus hidrolisados obtidos com pepsina seguida de tripsina foram relatados com potencial antioxidante (CONWAY, GAUTHIER E POULIOT, 2013; WONG E KITTS, 2003). No entanto, não existe nenhum relatório da atividade antioxidante dos hidrolisados *buttermilk* gerada com preparações comerciais de proteinases de qualidade alimentar. Entre as enzimas usadas industrialmente, Alcalase e Prolyve, duas proteinases de preparações de *Bacillus licheniformis* têm sido amplamente utilizados para gerar peptídeos bioativos a partir de proteínas alimentares (RIPÓLLES et. al., 2016).

A caseína pode apresentar atividade antioxidante em concentrações relevantes, enquanto o soro de leite é menos eficaz em concentrações semelhantes. Atividade antioxidante de proteínas do leite foi proposta em parte devido ao sequestro de metais de ferro e cobre pela fosfoserina, resíduos localizados na superfície da micela da caseína. Sugere-se também que as proteínas do soro de leite podem doar hidrogênio para reduzir os radicais livres, e que os grupos de sulfidril livres de cisteína são eficazes na inibição da autooxidação lipídica. Além disso a presença de enzimas antioxidantes e antioxidantes não enzimáticos no leite, (por exemplo, tocoferóis, carotenóides, citrato, fosfato, ácido ascórbico) também pode contribuir para o efeito antioxidante (WONG et. al., 2003).

Os peptídeos do *buttermilk* podem apresentar propriedade antioxidante. Consistindo geralmente de 3 - 20 resíduos de aminoácidos, esses peptídeos antioxidantes podem inibir a oxidação de lipídios ou proteínas por qualquer um dos vários mecanismos, dos quais os mais conhecidos são a eliminação de radicais livres e quelação de íons metálicos pró oxidativos (CONWAY et. al., 2013).

As BAL vêm sendo investigadas em relação à capacidade antioxidante. O interesse pelo papel das BAL como antioxidantes iniciou-se 1908, quando Metchnikoff sugeriu que o consumo de leite fermentado com *Lactobacillus* poderia prolongar a vida dos seres humanos (METCHNIKOFF, 1908).

O efeito antioxidante do extrato intracelular do *Bifidobacterium longum* (ATCC 15708) e *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356), foi investigada por Lin & Chang (2000). Este estudo demonstrou atividade antioxidante pela inibição da peroxidação do ácido linoléico (28 – 48 %) com as duas linhagens em estudo. As duas BAL apresentaram também capacidade em capturar o radical DPPH (21 - 52 %) do extrato intracelular. A inibição da

peroxidação lipídica do plasma também foi avaliada, demonstrando que ambas as linhagens foram capazes de proteger o plasma contra a oxidação.

Lin & Yen (1999) investigaram a atividade antioxidante de 19 linhagens de bactérias lácticas, dentre elas: *Lactobacillus acidophilus* B, E, N1, 4356, LA-1, e Farr; *Lactobacillus bulgaricus* 12 278, 448, 449, LB, 1006 e 11 842; *Streptococcus thermophilus* 821, MC, 573, 3641, e 19 987, e *Bifidobacterium longum* B6 e 15 708. Através do extrato intracelular, observou-se que todas as linhagens demonstraram atividade antioxidante pelos métodos de inibição da auto-oxidação do ácido ascórbico, capacidade quelante de íons metálicos e captura de espécies reativas ao oxigênio. Porém, atividade antioxidante pela enzima superóxido dismutase (SOD) não foi demonstrada por estas espécies de BAL.

Zanoni et al. (2008), investigaram três linhagens de BAL, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus plantarum* e *Streptococcus thermophilus*, que foram caracterizadas com relação à capacidade antioxidante. Todas as linhagens, *B. lactis* B 933, *L. plantarum* LP 1 e *S. thermophilus* Z 57, apresentaram atividade antioxidante pelos métodos de inibição da peroxidação lipídica e da auto-oxidação do ácido ascórbico, semelhante aos resultados encontrados por Lin & Yen (1999), Lin & Chang (2000) e Kullisaar et al. (2002).

2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A escolha da enzima adequada é de crucial importância para obtenção de compostos com características físico-químicas e nutricionais específicas. Existem diferentes tipos de proteases e suas fontes podem ser animais, plantas ou micro-organismos (DAMODARAN, 2010). As enzimas que pertencem ao alimento são chamadas de endógenas e aquelas que são adicionadas ao alimento para causar alguma mudança desejável são chamadas de exógenas. As enzimas exógenas são subdivididas em quatro classes de acordo com o seu comportamento catalítico: as serina proteases, proteases aspárticas (ácidas), as cisteína (sulfidril) proteases, e as metaloproteases. As serina proteases têm seletividade tanto pelo reconhecimento do resíduo N-terminal quanto do C-terminal. Proteases aspárticas (ácidas) se caracterizam por agirem em valores de pH ácidos e por reconhecerem resíduos de aminoácidos apolares. Cisteína (sulfidril) proteases tem ampla seletividade para ligações peptídicas, com preferência por aminoácidos aromáticos, básicos e apolares. As metaloproteases em sua maioria são exoenzimas e necessitam de Zn^{2+} para a sua atividade (DAMODARAN, 2010).

Enzimas proteolíticas são classificadas como endopeptidases, quando hidrolisam ligações peptídicas dentro da molécula de proteína ou exopeptidases, que removem

aminoácidos das posições N e C-terminal (CLEMENTE, 2000). As exopeptidases podem ainda ser divididas em duas subclasses: as carboxipeptidases, caso sejam específicas para C-terminal e as aminopeptidases, caso sejam específicas para N-terminal (DAMODARAN, 2010). Exopeptidases são úteis para eliminar o sabor amargo característico de peptídeos hidrofóbicos liberados pela proteólise com endopeptidases (DAMODARAN, 2010).

A enzima empregada e sua especificidade também pode influenciar na eficiência da redução da resposta alergênica (KLEBER, et al., 2004). Sabadin, et al. (2012) avaliaram a antigenicidade de hidrolisados de β -lactoglobulina produzidos por diferentes enzimas e obtiveram maior grau de hidrólise com uso de Alcalase. Os mesmos autores obtiveram peptídeos de massa molecular menor que 6,5 kDa da hidrólise de β -lactoglobulina, o que mostra a ampla especificidade da enzima.

A agregação de peptídeos durante a hidrólise enzimática de algumas proteínas globulares tem sido relatada em alguns estudos (OTTE, LOMHOLT, IPSEN, et al., 1997; CREUSOT e GRUPPEN, 2007; CREUSOT e GRUPPEN, 2008). Essa agregação ocorre devido à exposição de grupos hidrofóbicos que estavam ocultos na proteína nativa (CREUSOT e GRUPPEN, 2007). Groleau, et al. (2003), observaram agregação de hidrolisados de β -lactoglobulina produzidos com tripsina. Cresout e Gruppen (2008) relataram a formação de agregados de peptídeos durante a hidrólise de isolados proteicos de soro por tripsina. Doucet, Gauthier e Foegeding (2001) observaram agregação de hidrolisados de isolados proteicos de soro produzidos com Alcalase. Os agregados, geralmente, são formados por peptídeos de 2 a 6 kDa associados por interações hidrofóbicas e, em menor escala, interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio (POULIOT, et al., 2009).

As interações hidrofóbicas são favorecidas em temperaturas entre 70 e 90 °C (DAMODARAN, 2010). Quando a enzima livre é utilizada para catálise, a reação muitas vezes é interrompida por aquecimento a 90 °C, o que pode favorecer ainda mais a formação dessas interações.

A otimização das condições de hidrólise deve ser elucidada para preparar hidrolisados de proteínas com maior atividade (GUO et al. 2009).

Biopeptídeos obtidos após a hidrólise podem exercer efeitos fisiológicos positivos na saúde humana. Esses efeitos são provocados por sua interação com alvos específicos do corpo, imitando assim peptídeos fisiologicamente relevantes. Os biopeptídeos são derivados de proteínas alimentares, sendo assim alternativas naturais populares para o gerenciamento de distúrbios metabólicos comuns. (ARPITHA; BRIJESHA; APARNA, 2019). Exercem seu efeito no nível da proteína inibindo enzimas metabólicas, influenciando mudanças

conformacionais, regulando genes diretamente ou interagindo com reguladores transcricionais. Da mesma forma, podem interagir diretamente e remover os metabólitos, ajudando a manter a homeostase. Eles compartilham características estruturais com peptídeos endógenos do organismo que funcionam como hormônios, neurotransmissores ou peptídeos reguladores e, portanto, podem interagir com os mesmos receptores e atribuir funções além da nutrição básica (ARPITHA; BRIJESHA; APARNA, 2019).

A hidrólise enzimática da caseína é realizada por endopeptidases, que hidrolisam a ligação peptídica entre a fenilalanina (105) e a metionina (106) da cadeia peptídica da κ -caseína, eliminando a capacidade estabilizante e gerando como produtos uma porção hidrofóbica (para- κ caseína) e uma hidrofílica chamada glicomacropéptido, ou mais apropriadamente, caseínomacropéptido, provocando a desestabilização da micela com consequente precipitação da caseína do leite (Ordoñez, 2005). Segundo Kilara (1996), a hidrólise enzimática da proteína resulta em: diminuição do peso molecular, aumento do número de grupos ionizáveis e exposição de grupos hidrofóbicos que estavam protegidos na estrutura original da proteína.

A atividade da enzima está relacionada com a diminuição da energia de ativação requerida para transformar um substrato, aumentando a velocidade de reações específicas. A especificidade da enzima define a sua afinidade por grupos específicos em um determinado substrato (GALVÃO, 2004).

Estudos demonstram que um maior grau de hidrólise diminui o peso molecular dos peptídeos, a composição e sequência aminoácida destes peptídeos que tem influência direta na sua ação antioxidante (CHEUNG et al., 2012, CORRÊA et al., 2014, ISMAIL, 2010, PENG; SARMADI; XIONG; KONG, 2009, PHELAN et al., 2009) como no caso da presença de metionina (BLANCA HERNÁNDEZ-LEDESMA, et al., 2005). 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 molecular que normalmente apresenta mais atividade antioxidante ocorre especialmente na faixa de 0,5 – 3 kDa (CHEUNG et al., 2012).

O grau de hidrólise excessivo produz alto teor de aminoácidos livres resultando em produtos de alta osmolalidade (GUADIX et al., 2006). A formação de peptídeos de baixo peso molecular com resíduos hidrofóbicos de aminoácido pode resultar em produtos com sabor amargo, aspecto indesejável a parte sensorial (SUJITH et al., 2011). Para a remoção do amargor, alguns casos são necessários processos posteriores de tratamento do hidrolisado (SAHA E HAYASHI, 2001). A análise desses compostos requer equipamentos como

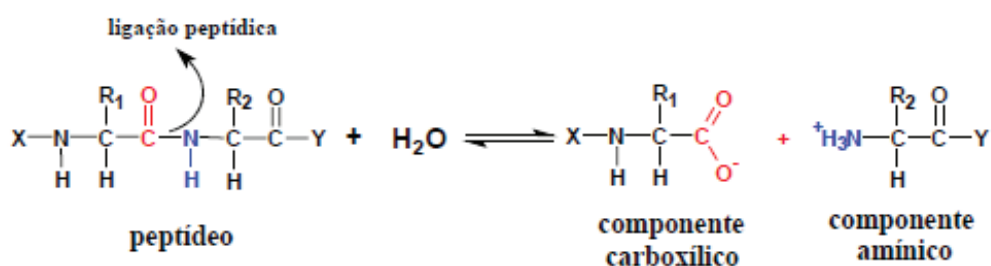
espectrofotômetros e cromatógrafos, eletroforese em gel e técnicas de concentração e purificação.

Alguns peptídeos bioativos são capazes de resistir à ação das proteases, estando relacionada à sua estrutura característica. Peptídeos incluindo prolina ou hidroxiprolina e dipeptídeos ou oligopeptídeos com prolina no terminal C não são hidrolisados por enzimas digestivas (BOELSMA; KLOEK, 2009; MAENO et al., 1996; VAN PLATERNIK et al., 2006).

Neste trabalho serão utilizadas enzimas proteolíticas, testadas anteriormente por Seguenka (2015) e Verdi (2017). A reação catalisada por esse grupo de enzimas é a hidrólise de ligações peptídicas de uma proteína, mas também hidrolisam ligações ésteres (-COOR), tiol-ésteres (-COSR) e amidas (-NH₂).

Conforme Figura 2, a natureza do grupo R1 ou R2 é o maior fator diferenciador das enzimas proteolíticas. A natureza dos constituintes X e Y permite separar as enzimas proteolíticas em endopeptidases e exopeptidases. As endopeptidases (por exemplo, alcalase, prolyve, lypaine, tripsina, quimotripsina e pepsina) hidrolisam randomicamente ligações peptídicas no interior da cadeia polipeptídica com máxima atividade quando X e Y são derivatizados (por exemplo, resíduos de aminoácidos). As exopeptidases (carboxipeptidases, aminopeptidases, dipeptidases e tripeptidases) hidrolisam ligações peptídicas amino- ou carboxi-terminais. As aminopeptidases requerem que X seja um grupo H e preferencialmente que Y não seja um grupo OH. As carboxipeptidases requerem que Y seja um grupo OH e preferencialmente que X não seja um grupo H. As dipeptidases e tripeptidases requerem que X e Y sejam grupos H e OH, respectivamente (ABELES et al., 1992; WHITAKER, 1994).

Figura 2: Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica, catalisada por uma enzima proteolítica.



Fonte: TARDIOLLI, 2003.

As peptidases removem aminoácidos ou pares de aminoácidos a partir dos terminais da cadeia polipeptídica, sejam eles amino (terminal de atuação de aminopeptidases) ou

carboxi-terminais (terminal de atuação de carboxipeptidases). Essas enzimas são muito ineficientes na degradação de proteínas intactas e, portanto, são sempre usadas após ou em conjunto com uma endoprotease (Pawlett e Bruce, 1996). Esta por sua vez, se estiver operando em seu pH ótimo, reduzirá drasticamente o tamanho da molécula de proteína, e os pequenos peptídios produzidos serão mais solúveis (GODFREY, 1996).

2.3.1 Endopeptidases

Atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N- e C-terminal. A presença de grupos α -amino ou α -carboxila tem um efeito negativo na atividade da enzima. Como exemplo de endopeptidase, é a Alcalase, uma serina protease não específica produzida pelo *Bacillus Licheniformis*. Seu principal componente enzimático é a subtilisina, formada por uma única cadeia polipeptídica com 274 resíduos de aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 27 kDa (TARDIOLI, 2003; TARDIOLI, PEDROCHE, GIORDANO, et al., 2003).

A Alcalase quebra ligações peptídicas das quais participam resíduos de aminoácidos aromáticos (Phe, Trp, e Tyr), ácidos (Glu), sulfurados (Met), alifáticos (Leu e Ala), hidroxil (Ser) e básicos (Lys) no lado carboxílico (DOUCET, OTTER, GAUTHIER, et al., 2003; DONLON, 2007). O pH ótimo de atuação varia de 6,5 a 8,5 (YUST, PEDROCHE, et al., 2010), enquanto que em pH 1 e 2 a enzima sofre desnaturação e ao redor de pH 4 uma mistura de enzima ativa e desnaturada pode levar à autólise (TARDIOLI, 2003).

A alcalase foi determinada por Konrad et al. (2013) como a enzima com maior atividade proteolítica de seleção enzimática baseada na maior geração de peptídeos de menor massa molecular, 89,84 % < 50 kDa. Um grau ótimo de hidrólise de 19 % com alcalase garantiu extensa hidrólise das proteínas do *buttermilk* com digestão quase completa do material de massa molecular maior presente no *buttermilk* de partida, $0,25 \pm 0,02$ % e $92,10 \pm 0,6$ % > 100 kDa, respectivamente.

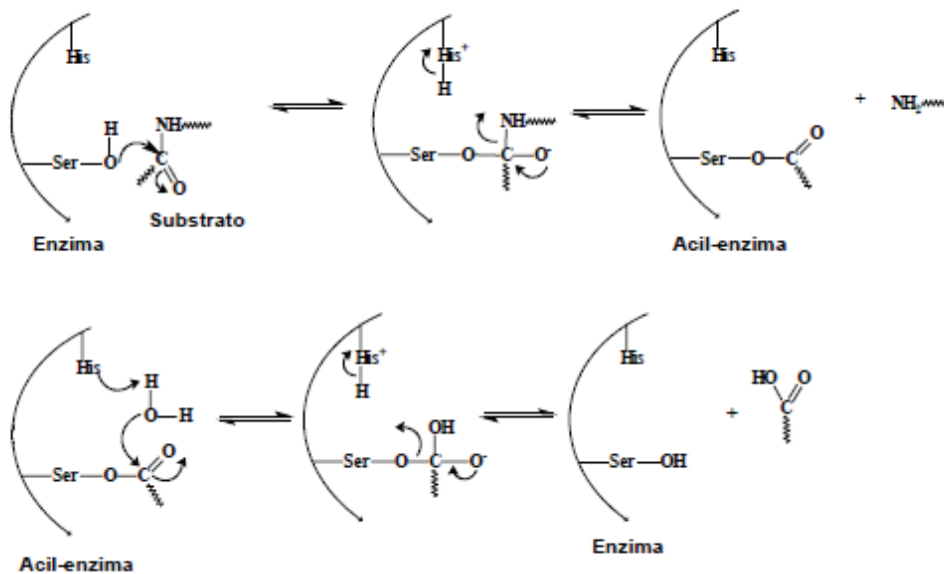
As enzimas deste grupo catalisam a hidrólise de ligações peptídicas pelo ataque nucleofílico sobre a ligação carbono-oxigênio assistida pela doação de um próton para o nitrogênio peptídico. Os resíduos de aminoácidos Asp, Ser e His atuam como nucleófilos e doadores de prótons. As serina-proteases dos mamíferos (quimotripsina tripsina e elastase) possuem a mesma seqüência próxima do resíduo Ser do sítio ativo (-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-), enquanto a subtilisina (serina-protease bacteriana) tem a seqüência Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Ser-. Além disso, os resíduos que formam a tríade catalítica dessas enzimas estão

localizados em posições diferentes na cadeia polipeptídica: Asp102, His57 e Ser195, para quimotripsina, tripsina e elastase, e Asp32, His64 e Ser221, para a subtilisina (KENNEDY, 1987).

A alcalase é classificada como uma subtilisina, caracterizada pelo seu desempenho a altas temperaturas e moderada alcalinidade, e é produzida por fermentação submersa de um microorganismo não patogênico do gênero *Bacillus* (NOVO, 1994).

As subtilisinas são moléculas compactas e quase esféricas, com um diâmetro ao redor de 42 Å e com aproximadamente 30% da estrutura em α -hélice, distribuída em 8 segmentos. O interior da molécula é composto quase inteiramente por resíduos de aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas. As subtilisinas são desnaturadas a pH entre 1 e 2, enquanto ao redor do pH 4 uma mistura de enzima ativa e desnaturada dará origem à autólise. Em altos valores de pH ($\text{pH} > 11$), a estrutura da molécula de subtilisina também é desestabilizada. O mecanismo de ação desta enzima está demonstrado na Figura 3.

Figura 3: Mecanismo de ação das subtilisinas



Fonte: TARDIOLLI, 2003.

Neste mecanismo, o substrato (polipeptídeo ou proteína) liga-se no sítio ativo da enzima. A ligação peptídica susceptível é posicionada próxima ao grupo hidroxila do resíduo Ser195 pela ligação da cadeia lateral hidrofóbica do aminoácido adjacente em uma cavidade hidrofóbica da enzima. Há a formação de um intermediário covalente entre o grupo acil do substrato e a hidroxila do resíduo Ser195. A hidroxila perde seu átomo de hidrogênio,

o qual é fortemente atraído pelo nitrogênio do grupo imidazol da His57. Forma-se, após, uma ligação éster entre o oxigênio da Ser195 e o átomo de carbono do grupo acil do substrato, com a quebra da ligação peptídica. O primeiro produto (amino-terminal) deixa o sítio ativo com a permanência do complexo acil-enzima ligação éster instável, comparada com a ligação peptídica, é hidrolisada, com a participação de uma molécula de água, e o segundo produto (carboxi-terminal) deixa o sítio ativo com a recuperação do átomo de hidrogênio pela Ser195. O grupo imidazol da His57 age como base geral, retirando um próton do grupo hidroxila da Ser195 e a His57 protonada age como um ácido, doando um próton para o grupo amino de saída. A função do grupo Asp102 é aparentemente auxiliar a atração do átomo de hidrogênio da Ser195 pelo grupo imidazol da His57, estabilizando a carga positiva formada. Isto previne a formação de uma carga positiva muito instável na hidroxila da Ser195 e aumenta sua nucleofilicidade. Nas fases de acilação e deacilação, o oxigênio carbonila do substrato adquire uma carga negativa no estado de transição. Esta carga é formada dentro de uma cavidade na enzima, chamada fenda oxianion, e é estabilizada por ligações de hidrogênio aos nitrogênios amida da Gly193 e da Ser195. Assim, a menos da especificidade da enzima, regida pelo resíduo de posicionamento, a catálise de todas as serina-proteases é feita segundo esse mecanismo (LENINGHER, 1988).

2.3.2 Exopeptidases

As exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas na região N ou C terminal. Aquelas que atuam na região amino terminal livre liberam um único resíduo de aminoácido (aminopeptidases), um dipeptídeo (dipeptidil-peptidases) ou um tripeptídeo (tripeptidil-peptidases). As exopeptidases que atuam na região carboxi terminal livre liberam um único aminoácido (carboxipeptidases) ou um dipeptídeo (peptidil-dipeptidases). Como exemplo de exopeptidase, a metaloendoprotease, neutrase, oriunda da bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* é inibida por agentes quelantes, por conter um íon metálico no sítio ativo, participante do mecanismo catalítico, é mais ativa em pH neutro (ABELES *et al.*, 1992; WHITAKER, 1994).

A enzima, neutrase, facilita a síntese enzimática de oligopeptídeos por reação de proteólise reversa com zinco metálico como co-catalisador. Pertence à mesma família de proteases que a termolisina, um endoprease metálica dependente de zinco. A termolisina é uma metalo-endopeptidase com sítio ativo, especificidade e mecanismo catalítico muito similar aos da carboxipeptidase. A termolisina, na forma imobilizada, tem sido utilizada com

sucesso em processos industriais para a síntese de um intermediário de aspartame. A resolução cinética de amino ésteres é uma metaloproteína de zinco neutra que hidrolisa aleatoriamente ligações peptídicas internas e também facilita a síntese enzimática de oligopeptídeos pela reação de proteólise reversa de metal de zinco como co-catalisador (KENNEDY, 1987; WHITAKER, 1994).

2.4 BIORREADORES PARA BUTTERMILK

Processos em batelada para hidrólise de proteínas são comumente empregados para obtenção de peptídeos (PEREA; UGALDE, 1996). O termo biorreator é utilizado para indicar principalmente reações enzimáticas, mas é também utilizado quando se aliam processos de separação e reação, como hidrólise enzimática e Processos de Separação por Membranas (PSMs).

O uso de processos combinados de reação e separação apresentam vantagens especialmente quando a reação é enzimática, removendo os peptídeos do meio reacional e selecionando o peso molecular dos produtos pelo tamanho de corte da membrana. (CHEISON et al., 2006; PRIETO et al., 2007).

Nos últimos vinte anos, muitos trabalhos foram realizados para desenvolver métodos técnicos para concentrar e isolar o material da membrana do glóbulo de gordura do BM, especialmente os fosfolipídios (PLs). Vários estudos relataram a concentração de PLs de *buttermilk* usando MF ou UF (ASTAIRE, WARD, ALEMÃO JIMÉNEZ-FLORES, 2003; CORREDIG, ROESCH, DALGLEISH, 2003; JIMÉNEZ-FLORES MORIN, 2005; MORIN, BRITTEN, JIMÉNEZ-FLORES, & POULIOT, 2007; MORIN, JIMÉNEZ-FLORES POULIOT, 2004; MORIN, POULIOT JIMÉNEZ-FLORES, R., 2006).

Dewettinck et al., (2008) usaram tratamentos químicos, como a adição de citrato de sódio para dissociar a micelas de caseína, cálcio para precipitar fragmentos MFGM (termocálpicos agregação) e tratamentos enzimáticos para hidrolisar proteínas e ultrafiltração em combinação com diafiltração, para remover a lactose e os minerais e para concentrar as PLs no produto final. Esses autores usaram filtração por membranas, para separar seletivamente os componentes de acordo com o tamanho. Fragmentos de MFGM foram recuperados no retentado e proteínas foram obtidas na fração de permeado. 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).

No biorreator a enzima solúvel fica no retentado da membrana, enquanto os produtos com tamanho menor ao peso de corte permeiam através da membrana (GUADIX, CAMACHO, GUADIX, 2006).

Vários estudos abordam a utilização de membranas para obtenção da fração de Pls. Poucos estudos relatam a utilização das proteínas visando seu reaproveitamento.

2.5 ULTRAFILTRAÇÃO DOS HIDROLISADOS PROTEICOS

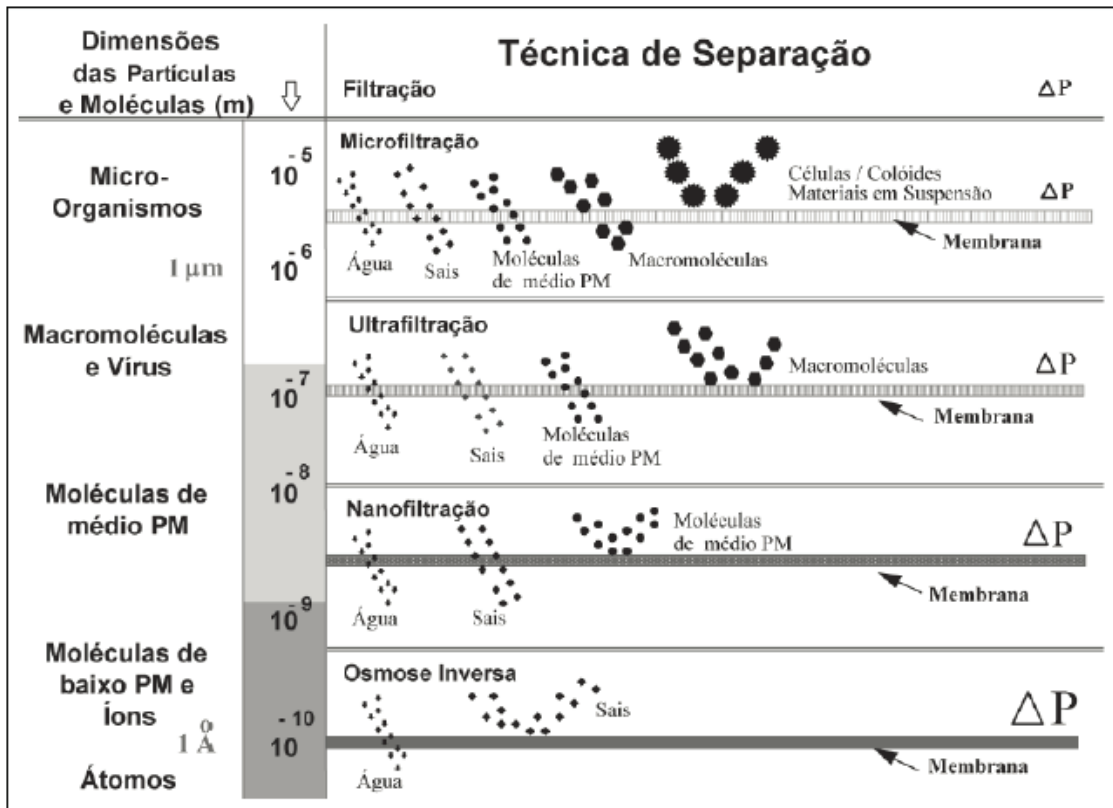
O PSM é uma tecnologia de alta eficiência desenvolvida no final do século XX, reconhecida como um dos processos mais promissores ainda no século XXI. A tecnologia de membranas apresenta baixo consumo de energia, alta eficiência em operações unitárias, processo simples e não polui o meio ambiente. Vêm sendo largamente utilizada na indústria química, de alimentos, proteção ambiental, medicamentos, produtos eletrônicos e entre outros setores industriais (ZHANG et al., 2019).

Esta tecnologia visa 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).

No campo das tecnologias de separação, os processos com membranas são com frequência economicamente preferíveis aos processos clássicos de separação (SARMENTO, 2007), em algumas aplicações estes processos se apresentam como a única alternativa técnica de separação (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Na produção de compostos com elevado grau de pureza, essa tecnologia se apresenta como uma alternativa promissora viável (SARMENTO, 2007). Em geral, são aplicados gradientes de pressão, concentração, temperatura ou potencial elétrico para gerar o movimento das espécies químicas envolvidas através da membrana (MULDER, 1996; RODRIGUES, et al., 2003).

Em processos que utilizam membranas porosas, a capacidade seletividade esta diretamente associada à relação entre o tamanho das espécies presentes e o tamanho dos poros da membrana (Figura 4). Este é o caso de processos como a microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e osmose inversa (OI) (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Essas quatro operações são as mais utilizadas nas indústrias de laticínios (CARVALHO; MAUBOIS, 2010).

Figura 4: Características de processos que utilizam diferença de pressão como força motriz.



Fonte: HABERT; BORGES; NÓBREGA (2006).

O emprego dos PSM na purificação de efluentes da indústria de alimentos, com o objetivo de reutilizá-los, apresenta-se como um desafio. O reuso dessa fração concentrada (ou retida) apresenta-se como uma motivação adicional, pois muitas vezes é uma corrente rica em nutrientes e sais (BRIÃO; TAVARES, 2007). Um estudo de Brião et al. (2019) demonstrou o potencial de recuperação de sólidos do leite de águas de primeiro enxágue para aplicação em doce de leite e bebida láctea. Portanto, os PSM apresentam um grande potencial para recuperação de correntes na indústria de laticínios.

Apesar de o fluxo ser reduzido pelo fenômeno de incrustação, a ultrafiltração ainda continua sendo o método mais usado pelo custo e benefícios que proporciona. Técnicas de concentração e purificação do soro do leite tem um olhar diferenciado pela indústria, desde a indústria alimentícia com suplementação à indústria nutracêutica e farmacêutica (OZORIO, 2019). Aliar processos de hidrólise e posteriormente filtração por membranas auxilia na padronização do tamanho molecular dos peptídeos, além de ser uma forma de separar a enzima, visto que possui um alto peso molecular.

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 (BORGES; HABERT; NÓBREGA, 2006).

A separação dos nutrientes, principalmente proteínas e gordura, por ultrafiltração deve ser realizada em condições operacionais que permitam obter a máxima retenção destes compostos, separando um permeado com menor carga orgânica. A pressão de operação tem efeito direto no fluxo permeado, enquanto que a velocidade tangencial minimiza a polarização de concentração na corrente do retido, e pode refletir tanto no fluxo permeado quanto na eficiência de separação (BRIÃO; TAVARES, 2012).

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).

Ao passo que a tecnologia de membranas apresenta aspectos favoráveis a produção de hidrolisados, também há aspectos negativos associados 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.

Nos últimos anos diversos autores têm estudado isoladamente a influência de cada componente no fenômeno da incrustação. Estudos 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 β -lactoglobulina não é sensível ao cisalhamento do fluxo (STEINHAEUER et al., 2015; STEINHAEUER et al., 2015).

A β -lactoglobulina 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 β -lactoglobulina durante o processamento térmico, cuja formação da rede de gel que causa a incrustação na membrana é facilitada pela presença de cálcio (STEINHAEUER, et al., 2015).

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).

A pressão mais baixa resulta em uma pureza menor, porque o transporte de massa é principalmente contribuído pela difusão e, portanto, nem todas as substâncias com massa molecular abaixo do limite da membrana de UF podem ser transmitidas através da membrana. O aumento da pressão transmembrana acima do fluxo crítico indica que o balanço da convecção de partículas e a remoção da polarização de concentração mudou para a camada de incrustação e assim o corte real da membrana se tornou menor do que o limite de corte da massa molecular nominal (ZHANG et. al., 2011).

2.5.1 Seletividade da membrana

A permeabilidade da membrana pode ser entendida como uma medida da maior ou menor facilidade que a membrana oferece a passagem de um dado solvente. O inverso da permeabilidade é a medida da resistência (rejeição) que o meio oferece ao transporte (HABERT et al., 2006).

A eficácia dos PSM é estabelecida pela rejeição (R) da membrana frente ao componente que se deseja separar (SCHNEIDER; TSUTIYA, 2001). Este coeficiente estabelece a percentagem de um componente retido pela membrana em um processo de separação e é dado pela Equação 1 (MULDER, 1996; ATRA et al, 2005; CUARTAS-URIBE et al., 2009).

$$R = \left(1 - \frac{C_P}{C_R}\right) \cdot 100 \% \quad (1)$$

Sendo:

C_P : concentração do permeado

C_R : concentração do rejeito

A rejeição é apresentada em termos percentuais, e o conceito utilizado para definir o peso molecular de um soluto no qual a membrana apresenta rejeição é o corte que ela possui. Sendo assim, a membrana que apresentar um corte de 40.000 Da terá rejeições acima de 90% para solutos com peso molecular maior que este corte. Entretanto, a massa molecular não deve ser considerada como o único critério de seletividade de uma membrana porosa. Muitas vezes, os compostos rejeitados formam uma camada na superfície da membrana, que atua como uma membrana dinâmica capaz de reter com mais eficiência outros compostos (MULDER, 1996).

2.5.2 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.

A separação dos nutrientes, principalmente proteínas e gordura, por UF deve ser realizada em condições operacionais que permitam obter a máxima retenção destes compostos, separando um permeado com menor carga orgânica. A pressão de operação tem efeito direto no fluxo permeado, enquanto que a velocidade tangencial minimiza a polarização de concentração na corrente do retido, e pode refletir tanto no fluxo permeado quanto na eficiência de separação (BRIÃO; TAVARES, 2012).

Os fluxos de permeado em UF situam-se na faixa de 150 a 250 L/h.m². 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).

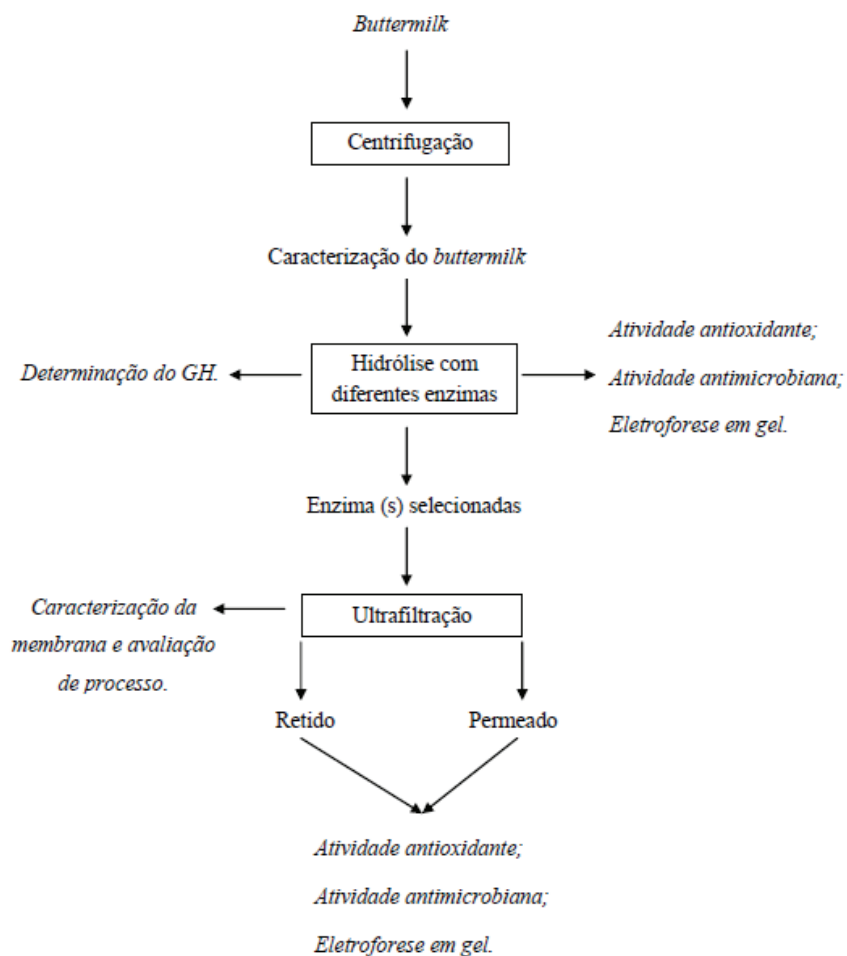
As principais causas de redução dos fluxos de permeado estão associadas a polarização por concentração, que causa um rápido declínio, e a incrustação, que causa

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 (BRIÃO; TAVARES, 2012; GIRARD; FUKUMOTO, 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Na Figura 5, podem-se observar os processos utilizados neste trabalho. O *buttermilk* foi inicialmente centrifugado, visando a redução da gordura, após, caracterizado e submetido à hidrólise enzimática utilizando diferentes enzimas comerciais em batelada individuais (Alcalase, Neutrase, Prolyve e Lypaine) e bateladas conjuntas (Alcalase + Neutrase), deste modo, adicionou-se a primeira enzima e em sequência a segunda enzima, utilizando como parâmetro de tempo de adição o grau de hidrólise. O *buttermilk* hidrolisado foi submetido a análises de atividade antimicrobiana, antioxidante e eletroforese em gel. Essa etapa objetivou selecionar a melhor enzima para a hidrólise proteica. A melhor enzima (ou a combinação delas) foi então submetida ao BRM, fazendo-se a separação. As três frações do BRM (alimentação, retido e permeado) foram analisadas também quanto a atividade antimicrobiana, antioxidante e eletroforese em gel.

Figura 5: Fluxograma geral dos processos utilizados neste trabalho.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2019).

3.1 BUTTERMILK

O *buttermilk* foi fornecido pela empresa Randon S.A, localizada em Vacaria e coletado imediatamente após o batimento da manteiga e enviado sob refrigeração a 5° C para a Universidade de Passo Fundo (UPF), onde foram realizados os processos e análises citadas neste trabalho.

3.2 CENTRIFUGAÇÃO DO *BUTTERMILK*

Após chegar à UPF, o *buttermilk* foi centrifugado a 5000 RPM por 15 min para diminuição do teor de gordura e pasteurizado. Uma amostra foi coletada para a caracterização e o restante congelado em freezer (-18° C) para a posterior utilização.

O processo de centrifugação foi testado durante o processo de filtração comparando-se os fluxos do *buttermilk* centrifugado e do *buttermilk* sem o processo de centrifugação à 25°C e pressão de 1 bar.

3.3 HIDRÓLISE PROTEICA

Nesta etapa, para a hidrólise das proteínas, foram utilizadas diferentes enzimas indicadas para leite e soro de leite, sendo necessária, contudo, a avaliação da hidrólise no substrato *buttermilk*. A hidrólise foi testada em batelada, utilizando-se como resposta o GH. A enzima que obteve maior GH foi submetida ao BRM.

Para a hidrólise proteica, adicionou-se um litro de *buttermilk* em um béquer, mantendo-se sob agitação e temperatura controlada com o auxílio de uma manta de aquecimento de marca Fisatom. As concentrações das diferentes enzimas (calculadas em relação à carga proteica) e as temperaturas de hidrólise seguiram indicações dos fornecedores e foram ajustadas conforme a Tabela 3. O pH foi ajustado com NaOH 0,1 molar ou ácido láctico 0,5 molar.

Tabela 3: Enzimas, condições e inativação de hidrólise utilizadas

| Enzimas | Ação | pH | Temperatura (°C) | % enzima/concentração proteína | Inativação |
|----------|--------------------|-----|------------------|--------------------------------|--------------|
| Alcalase | Endoprotease | 8,0 | 55 | 0,5 | 90°C / 20min |
| Neutraxe | Metaloendoprotease | 7,0 | 55 | 1,25 | 90°C / 20min |
| Prolyve | Endoprotease | 8,0 | 55 | 0,5 | 90°C / 5min |
| Lypaine | Endoprotease | 8,0 | 65 | 0,2 | 90°C / 5min |

Fonte: Adaptado de Novozymes (2014), Soufflet Biotechnologies (2016) e Lyven (2015)

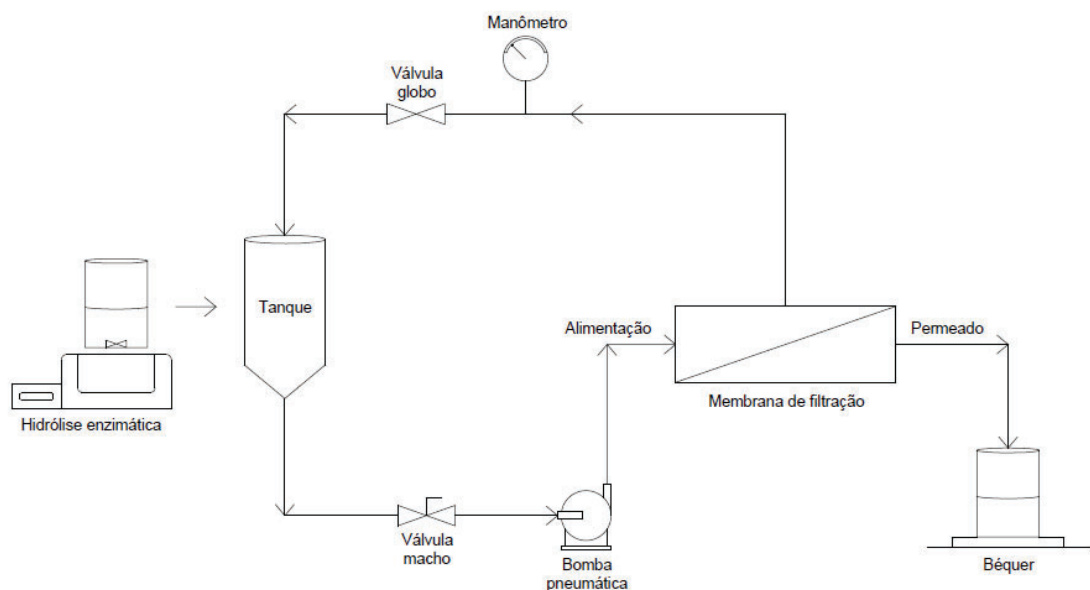
Além das enzimas e condições testadas da Tabela 3, uma quinta condição foi avaliada, pela ação sequencial da Alcalase + Neutrase, escolhidas por apresentarem diferentes mecanismos de ação (serina endoprotease e metaloendoprotease).

3.4 OPERAÇÃO DO BIORREATOR

Os ensaios foram conduzidos em batelada, iniciando com o processo de hidrólise e após a separação dos peptídeos por membrana de UF. Oito litros de *buttermilk* foram hidrolisados com a enzima sob a temperatura e pH de referência (conforme Tabela 3), com agitação constante. Após, o *buttermilk* hidrolisado foi alimentado ao equipamento piloto de separação por membranas (Figura 6), fornecido pela WGM Sistemas (São Paulo, Brasil).

O *buttermilk* hidrolisado foi bombeado através da bomba pneumática até o módulo de membrana, cujo fluxo se dá na forma tangencial. O equipamento é composto por um tanque de aço inoxidável com capacidade de 30 L sendo a pressão (100 kPa) ajustada com uma válvula de diafragma na linha de retido, lendo-se o fluxo permeado com o auxílio de um rotômetro na linha de permeado. O permeado foi coletado e o rejeito retornou para o tanque até que se atingiu uma redução de volume da alimentação de 4 vezes.

Figura 6: Esquema do Biorreator utilizado para a hidrólise proteica do buttermilk e separação dos peptídeos



Fonte: Elaborado pelo Autor (2019).

A membrana de ultrafiltração utilizada é de configuração tubular, com área efetiva de 0,1 m² e massa molar de corte de 30 a 80 kDa. A membrana foi selecionada por referência de Barry et. al. (2018), esses autores, concluíram que esta membrana permite a separação dos peptídeos e também difere do tamanho molecular das enzimas. A membrana foi submetida à limpeza química com solução de NaOH (pH 11) antes de cada experimento como demonstrado no Apêndice A.

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 foi criar uma referência de fluxo ideal para conduzir o procedimento de limpeza após os ensaios com a solução hidrolisada até que se reestabelecesse o fluxo inicial.

O tanque da Figura 6 foi alimentado com 8 L de água de Miliq e acionada a bomba, com reciclo total para o tanque. O permeado foi coletado e o fluxo calculado através da Equação 2. Tais medidas foram conduzidas com água, a 25°C, para fins de comparação de fluxo ideal no momento da limpeza, e a 55°C, simulando a mesma condição usada no ensaio.

$$F_p = V/t.A \quad (2)$$

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.

A permeabilidade foi medida com água de miliq com condutividade menor que 4 µs/cm, garantindo o não acúmulo de material na membrana. 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.

O fluxo da membrana se manteve próximo do valor de referência (150 a 250 L/h.m²) indicado pelo fabricante e 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, como mostra o Apêndice B.

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1 Caracterização físico-química

A caracterização do *buttermilk* e hidrolisados foi determinada no Laboratório de Serviço de Análise de Rebanhos Leiteiros (SARLE) da UPF, através do equipamento de Espectroscopia no infravermelho próximo (FTIR) de marca DELTA INSTRUMENTS, que segue a metodologia International Dairy Federation (IDF) 141C.

3.5.2 Grau de hidrólise

A avaliação do grau de hidrólise (GH) foi feita através do método do pH-stat. Para o cálculo de GH, seguiu-se a Equação 3, obtida pelas equações 4 e 5, sugerida por Adler-Nissen (1986).

$$GH (\%) = \frac{B \times N}{Mp \times a \times h} \times 100$$

(3)

sendo:

B: Volume de base consumida durante a hidrólise para manter o pH constante (mL);

N: Normalidade da base;

Mp: Massa de proteína (g);

a: Grau de dissociação;

H: Número total de ligações peptídicas antes da reação;

8mol equivalente/kg de proteína;

Para o Grau de dissociação, equação 4:

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pK - pH}} \quad (4)$$

sendo:

α : Grau de dissociação;

pK : Varia de acordo com a temperatura da reação;

pH : Constante;

Para o pK , equação 5:

$$pK = 7,8 + \left(\frac{298 - T}{298 \times T} \right) \times 2400 \quad (5)$$

sendo:

T : Temperatura em Kelvin.

Para o cálculo do GH, o conteúdo de base consumida foi registrado em função do tempo, inicialmente fixado em intervalos de 5 minutos e aumentando gradativamente para intervalos de 15 minutos até que as variações do consumo da base fossem insignificantes.

3.5.3 Caracterização dos peptídeos

3.5.3.1 Cálculo do comprimento médio da cadeia e da massa molecular média dos peptídeos

O cálculo do comprimento médio da cadeia (CMC) e a massa molecular média (MMM) dos hidrolisados, foram determinados através das Equações 6 e 7, respectivamente, assumindo-se que um resíduo de aminoácido possua massa média de 120 Da, conforme descrito por Perea et al. (1993).

$$CMC = \frac{100}{GH} \quad (6)$$

$$MMM = CMC * 120 \quad (7)$$

3.5.3.2 Eletroforese em gel

O perfil peptídico foi caracterizado em função do tamanho da cadeia dos peptídeos obtidos, relacionando 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: 5 % e 3 % no gel de aplicação da amostra 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 160 V 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.

3.5.4 Atividade antimicrobiana dos peptídeos

Duas cepas bacterianas, uma Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e uma Gram-negativas (*Escherichia coli*) foram utilizadas como indicadores para avaliar a atividade antimicrobiana das amostras de *buttermilk*. Baseado em Osman et. al., 2016, as culturas foram obtidas inoculando uma alça de cada cultura em 50 mL de caldo Mueller Hinton em frascos cônicos esterelizados de 100 mL. Os frascos foram incubados durante a noite na temperatura de 37 °C, ideal para o crescimento das cepas. Após a incubação, as culturas foram diluídas em solução salina até atingir turvação com concentração 0,5 de acordo com a escala padrão de McFarland, sendo equivalentes a $1,5 \times 10^8$ UFC/L, fazendo-se a leitura em espectrofotômetro.

A atividade antimicrobiana das amostras de *buttermilk* foi avaliada pelo ensaio de difusão em placas (BAUER et. al., 1966). Testes preliminares indicaram a necessidade da concentração das amostras, que foram submetidas à liofilização. 24 horas antes de serem liofilizadas, as amostras foram congeladas a -18°C para que toda a água presente ficasse no estado sólido e abaixo do ponto triplo da água, evitando formação de espuma no momento da aplicação do vácuo (GONÇALVES, 2015). As amostras foram colocadas em recipientes de alumínio e liofilizadas por dois dias, resultando em uma umidade média de 2% e um aumento de 10 vezes de concentração de amostras, resultando em teores de 26 g de proteína/100g. A velocidade de secagem foi em média de 0,5 mm a 1,0 mm de profundidade/h ou de 0,001 a 0,06 $^{\circ}\text{C/s}$, pressão inferior que 4,6 mmHg, temperatura de 0°C e vácuo 0,370 mbar.

Discos de papel estéreis (com um diâmetro de 5 mm) foram preenchidos com as amostras e colocados na superfície das placas de ágar Mueller Hinton anteriormente semeado com a cepa indicadora, contendo em seu centro um antibiótico padrão (Penicilina para *Staphylococcus aureus* e ampicilina para *Escherichia coli*). As placas foram armazenadas por 24 h sob condições ótimas de crescimento das cepas e foram posteriormente examinadas quanto à presença de zonas de inibição indicativas de atividade antimicrobiana, adotando-se valores de alo antimicrobiano > 10 mm.

3.5.5 Atividade antioxidante dos peptídeos

A atividade antioxidante 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^+ 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^+ na forma estável.

Uma solução de ABTS 7 mM (100 mL) foi misturada com solução de persulfato de potássio 2,45 mM (100 mL) para gerar o radical ABTS^+ , e 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 μM diluídas em álcool etílico, as quais reagiram com a solução de radical ABTS^+ (na proporção de 10 μL :1 mL, respectivamente) durante 6 minutos, e a absorbância lida à 734 nm.

As amostras de hidrolisados reagiram com a solução de radical ABTS⁺ (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⁺. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata.

A atividade antioxidante foi expressa em 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 8:

$$AA = \frac{((Abs734nm * a) + b) (\mu mol TE)}{mg \text{ de proteína}} \quad (8)$$

Sendo:

Abs 734nm: absorbância da amostra lida a 734 nm.

A porcentagem de inibição foi obtida através da equação 9, como sugerido por Conway, 2012.

$$\% I = \frac{(Ac - Aabs)}{Ac} \times 100 \quad (9)$$

Sendo:

Ac: Branco – amostra;

Aabs: Absorbância do *buttermilk*;

3.5.6 Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos foram expostos à análise estatística através da Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey, a 5% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO E CENTRIFUGAÇÃO DO *BUTTERMILK*

A caracterização do *buttermilk* foi realizada em triplicata. As amostras 1 e 2 são de lotes diferentes. Sua composição está descrita na Tabela 4.

Tabela 4: Caracterização do *buttermilk*

| Amostra | Gordura (%) | Proteína (%) | Lactose (%) | Caseína (%) | Sólidos Totais (%) | pH |
|---------|-------------|--------------|-------------|-------------|--------------------|-----------|
| 1 | 2,67±0,05 | 2,05±0,01 | 1,72±0,02 | 2,09±0,03 | 9,57±0,06 | 6,21±0,11 |
| 2 | 2,04±1,09 | 2,09±0,04 | 1,78±0,03 | 2,29±0,05 | 10,01±0,09 | 6,65±0,18 |

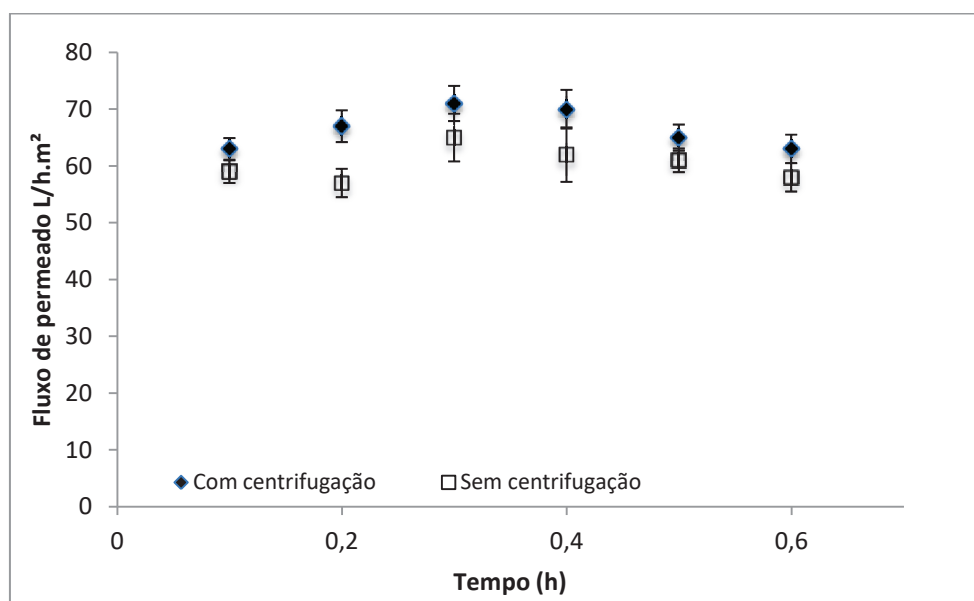
Fonte: Elaborado pelo Autor (2019)

Os valores encontrados estão de acordo com a literatura, onde Svanborg et. al., (2015) encontraram para o *buttermilk* valores de gordura (3±0,06), proteína (2,054±0,28), lactose (3,95±0,2), caseína (1,56±0,31), sólidos totais (7,10±0,52) e pH (6,84±0,19). Juliano et. al., (2015), encontraram valores para o *buttermilk* de gordura (1,30±0,01), proteína (3,01±0,28), lactose (3,60±0,04), e pH (6,6±0,01).

Segundo Sodini et al.(2006) e Gassi et al. (2008), diferenças na composição físico-química do *buttermilk* podem ocorrer devido à constituição do creme e as variáveis operacionais utilizadas na fabricação da manteiga.

O *buttermilk* centrifugado foi analisado quanto à interferência da gordura no fluxo de permeado durante a filtração por membranas à 25°C e pressão de 1 bar, conforme Figura 7.

Figura 7: Avaliação do fluxo de permeado com e sem o processo de centrifugação



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

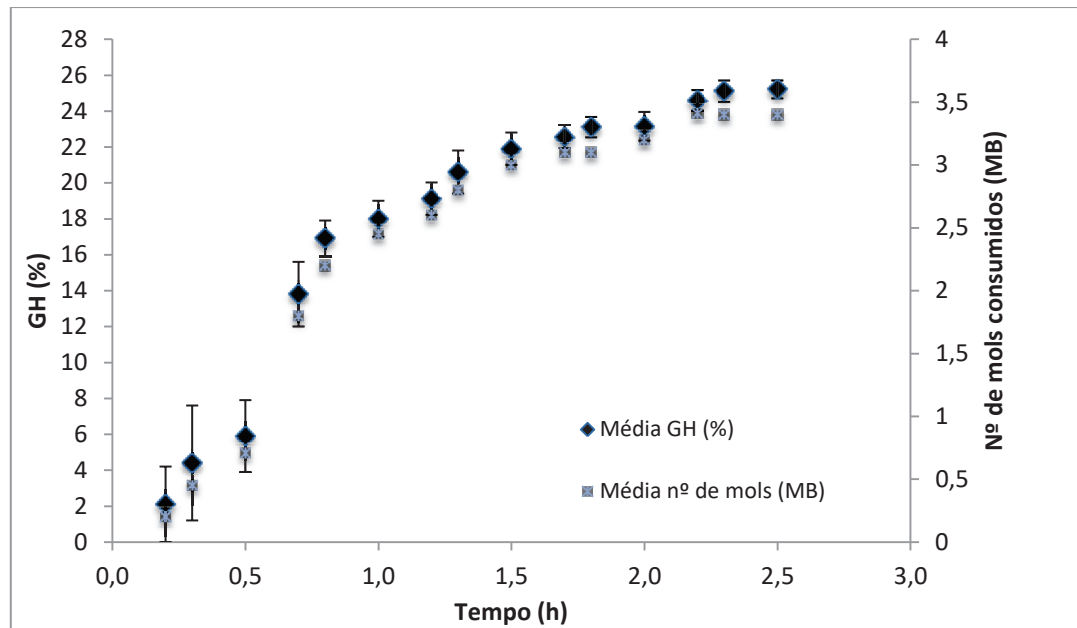
A filtração do *buttermilk* pode ser desafiadora devido à gordura residual e fragmentos de MFGM de vários tamanhos de partículas. As partículas maiores (fragmentos de manteiga e grandes glóbulos de gordura) podem ser removidas usando um separador de creme (Fauquant et al., 2014). Mas segundo Svanborg et. al (2015) não foi analisada nenhuma diferença na incrustação, quando ultrafiltrado o *buttermilk*.

Neste trabalho, o fluxo de permeado em diferentes tempos foi semelhante para ambas as amostras, não demonstrando diferença significativa (<5%), portanto, decidiu-se realizar a hidrólise com o *buttermilk* sem centrifugação, eliminando-se uma operação unitária no processo proposto

4.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO BUTTERMILK

O grau de hidrólise com média e Desvio Padrão (DP) para a enzima Alcalase, obtido neste trabalho está demonstrado segundo Figura 8.

Figura 8: Avanço do grau de hidrólise das proteínas do *buttermilk* e mmols de base consumida utilizando a enzima Alcalase® 2.4L



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

Ao final do processo, com 2,5 h, o grau de hidrólise máximo alcançado foi de 25,8 %, ou seja, 25,8 % 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, com o soro de leite, porém, com maior relação enzima:substrato. 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) com o soro de leite, obtiveram 16 % e 20 % de GH para as frações purificadas de α -La e β -Lg respectivamente, utilizando a mesma concentração enzima:substrato utilizada neste trabalho.

A Alcalase é uma serina endoprotease e embora venha sendo amplamente utilizada em várias aplicações biotecnológicas, sua especificidade não foi completamente caracterizada. Sabe-se que essa enzima hidrolisa principalmente ligações peptídicas contendo resíduos hidrofóbicos no lado carboxílico (ADLER-NISSEN, 1986). Adamson e Reynolds (1996) verificaram que, na hidrólise de caseína, a Alcalase hidrolisava preferencialmente ligações peptídicas contendo resíduos de Glu, Met, Leu, Tyr, Lys e Gln no lado carboxílico. Nitescu et al. (1996) verificaram que a Alcalase hidrolisava eficientemente ésteres de α -L-aminoácidos (Ala, Phe e Leu) com o grupo amino bloqueado e que 60% (base mássica) de uma preparação comercial podia ser atribuída à subtilisina Carlsberg (massa molecular de 27.534 Da). Smyth

e Fitz Gerald (1998) verificaram também especificidade desta enzima por resíduos de Tyr, Ala e Leu, por meio da hidrólise de substratos fluorogênicos. Kukman et al. (1995) hidrolisaram proteínas da soja com Alcalase e verificaram que os peptídios formados tinham resíduos hidrofóbicos carboxi-terminais, entre eles Ser, His, Tyr, Gly, Val, Phe e Leu. Todos esses trabalhos mostram a ampla especificidade desta enzima, podendo ser utilizada eficientemente na produção de um preparado contendo pequenos peptídios a partir das proteínas *buttermilk*, por exemplo.

Algumas proteínas do MFGM são parcialmente resistentes à hidrólise péptica como a butirofilina (Ye & Singh, 2011) ou lactadherina e xantina oxidase à hidrólise trípica (Vanderghem et al., 2011). Estas proteínas MFGM estão presentes como complexos de lipoproteínas e o constituinte de gordura protege-os parcialmente da digestão enzimática. O *buttermilk* possui 20 % dessas proteínas em sua composição, portanto, não sendo possível hidrolisá-las.

Segundo Pessato (2014), o GH variou de 18,1 a 23,9 % para a Alcalase hidrolisando o soro de leite. O aquecimento após a hidrólise para inativar a enzima livre pode contribuir para agregação dos peptídeos (PANYAM e KILARA, 1996), pois o aumento da temperatura favorece a formação de interações hidrofóbicas (DAMODARAN, 2010).

Uma vez que os hidrolisados de menor GH apresentaram maiores concentrações de α -La e β -Lg, os resultados sugerem que maior GH está relacionado com a diminuição da detecção dessas proteínas (PESSATO, 2014).

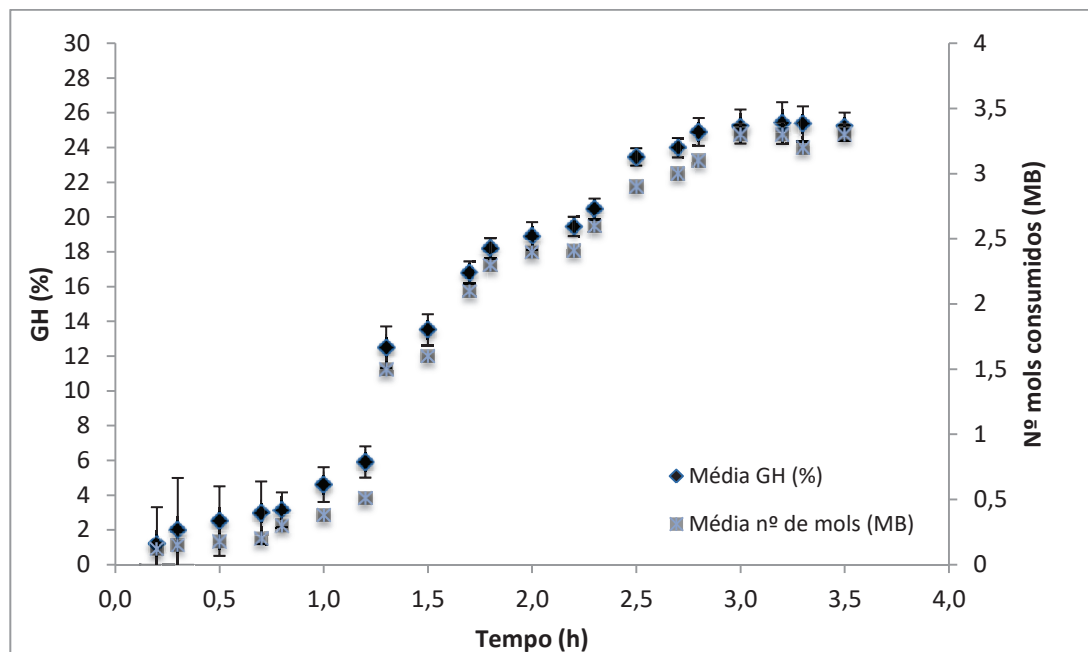
Peng, Xiong, e Kong (2009) obtiveram maior valor de GH utilizando condições semelhantes deste trabalho, porém com o soro de leite, o comportamento da curva foi observado: um aumento muito rápido durante a primeira hora seguido por aumento lento e gradual até o final da hidrólise, num tempo de 8 h. Moreno 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 à diminuição da atividade enzimática, entre os principais fatores.

A Alcalase cliva ligações peptídicas contendo principalmente resíduos hidrofóbicos no lado carboxílico. A redução do sabor amargo em hidrolisados com altos graus de hidrólise (por exemplo, 30 %) deve-se, provavelmente, conforme relata Adler-Nissen (1986), à degradação dos peptídios amargos, inicialmente produzidos, a peptídios com aminoácidos hidrofóbicos terminais. A redução do sabor amargo deve, provavelmente, à presença de aminopeptidases e carboxipeptidases na preparação da protease, particularmente encontradas em preparações de proteases fungais (Adler-Nissen, 1986).

O GH alcançado está relacionado com a especificidade da enzima utilizada. 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. Acredita-se que por esse motivo, o GH das proteínas do buttermilk estabilizou em 25,2% após 2,5 h de reação enzimática.

Assim como a Alcalase, a Prolive é uma endopeptidase, e seu resultado foi muito semelhante à Alcalase, como mostra a Figura 9.

Figura 9: Avanço do grau de hidrólise das proteínas do *buttermilk* e mmols de base consumida utilizando a enzima Prolive



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

Observa-se que o maior GH observado para a Prolive foi de 25,2 %, muito semelhante ao GH máximo da Alcalase (25,8 %). Ambas as enzimas são endoproteases, porém a Alcalase é uma serino-protease, com diferencial na sua sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional, apresentando Asp, His e Ser no sítio ativo, os substratos ligam-se à serino-protease através da inserção do aminoácido adjacente ao sítio de clivagem em uma cavidade no sítio ativo da enzima (Beynon e Bond, 1989; Whitaker, 1994).

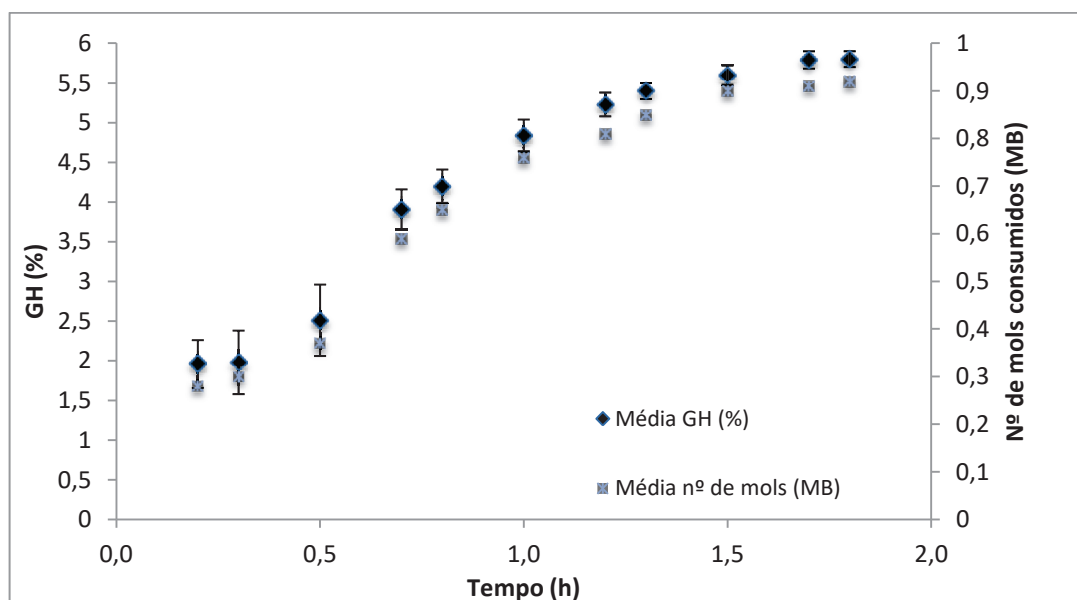
A enzima glutamil endopeptidase foi relatada estar presente na Alcalase e ausente no Prolive (SPELLMAN, et. al., 2005). Esta enzima quebra as ligações peptídicas após o ácido glutâmico no terminal C em substratos diferentes, como caseínas (ADAMSON e

REYNOLDS, 1996) e proteínas de soro de leite (DOUCET et. al., 2003). Isso pode explicar os valores mais altos para co-produtos com Alcalase em comparação com Prolyve. A diferente extensão da hidrólise produzida com cada enzima pode ser devida a especificidade enzimática e aos diferentes substratos submetidos a hidrólise.

A Prolyve alcançou crescimento significativo no seu GH somente após a primeira hora de hidrólise, chegando a um GH acima de 20 % em 2,5 h, tempo este em que a enzima Alcalase já havia alcançado GH acima de 25 %.

Foi testada também uma enzima exoprotease. O grau de hidrólise com média e DP obtido neste trabalho com a enzima Neutrase está demonstrado na Figura 10.

Figura 10: Avanço do grau de hidrólise das proteínas do *buttermilk* e mmols de base consumida utilizando a enzima Neutrase



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

Como já citado anteriormente, a exopeptidase, neutrase é mais ativa em pH neutro e facilita a síntese enzimática de oligopeptídeos por reação de proteólise reversa com zinco metálico como co-catalisador.

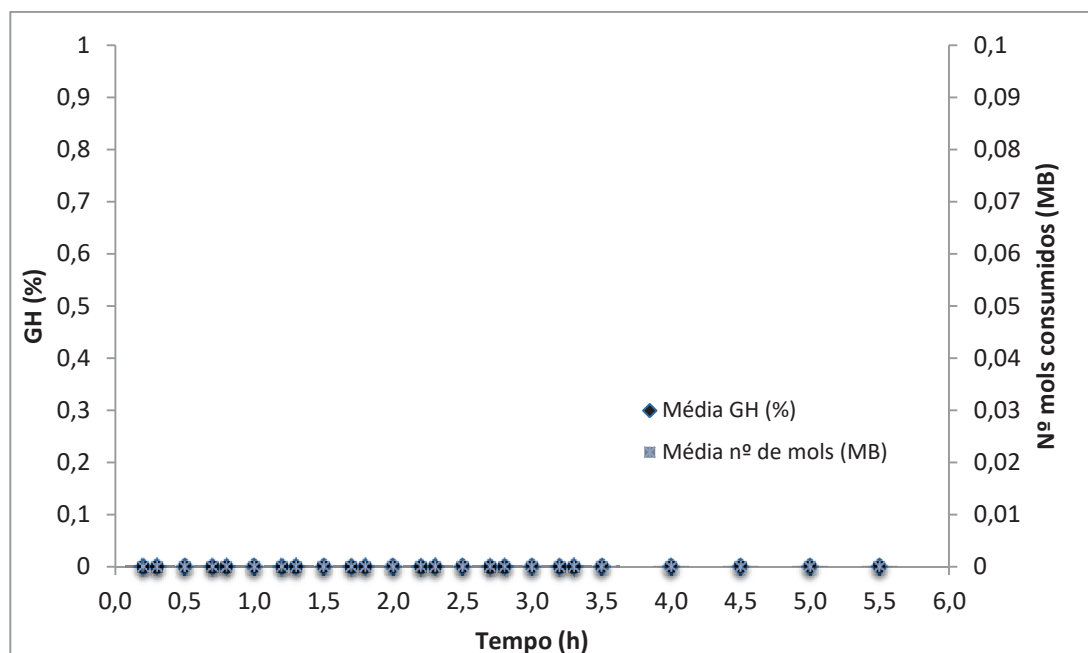
Para Martinez et. al (2005) e Popineau et. al. (2002), a hidrólise da proteína isolada de soro de leite com Neutrase mostrou o maior GH atingindo de 13% em 4h. Para os autores a hidrólise limitada é necessária para manter a estrutura ou sequência de peptídeos ativos e para garantir a funcionalidade. Vários estudos indicaram que a hidrólise limitada de proteínas pode dar origem a aspectos funcionais e organolépticos, propriedades alimentícias, propriedades de

gelificação (DOUCET et. al., 2001), atividade antioxidante (KONG e. al., 2006), e atividade redutora de colesterol (TSOU et. al., 2009).

Neste trabalho o maior GH encontrado para a enzima Neutrase foi de 5,89 % em 1,8 h, maiores tempos não foram atribuídos por já saber que a Neutrase atua removendo aminoácidos ou pares de aminoácidos a partir dos terminais da cadeia polipeptídica e é pouco eficiente na degradação de proteínas intactas sendo indicado o seu uso após ou em conjunto com uma endoprotease (Pawlett e Bruce, 1996). Assim, é possível reduzir drasticamente o tamanho da molécula de proteína, e os pequenos peptídios produzidos serão mais solúveis (Godfrey, 1996).

Já no teste com a enzima Lypaine (endoprotease), o resultado foi diferente. O grau de hidrólise com média e DP obtido neste trabalho com a enzima Lypaine está demonstrado na Figura 11.

Figura 11: Avanço do grau de hidrólise das proteínas do *buttermilk* utilizando Lypaine e mmols de base consumida



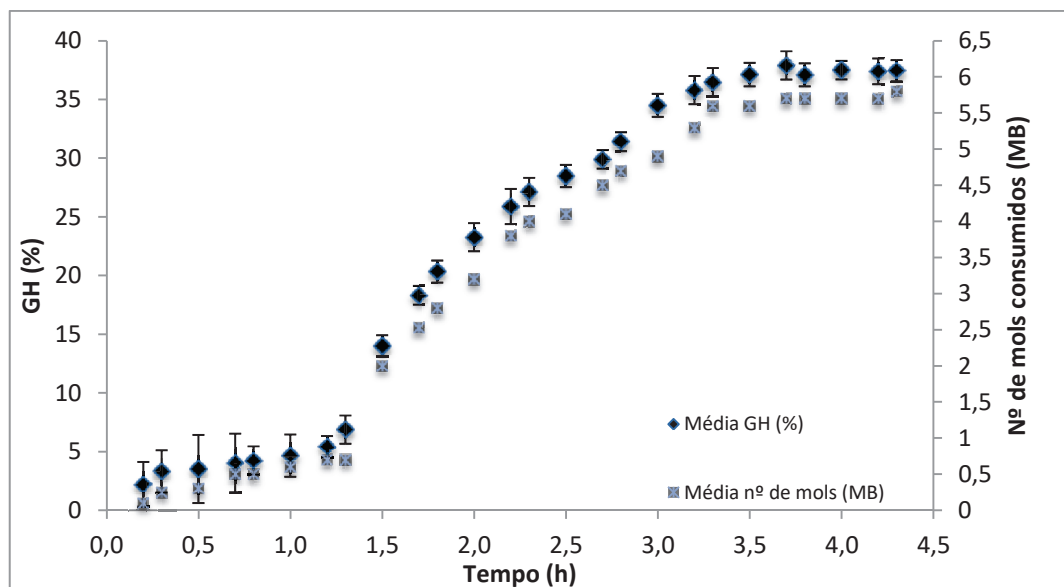
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

A enzima Lypaine é também uma endopeptidase, porém de origem vegetal, preparada através da papaína purificada. É uma proteinase de cisteína que degrada frações proteicas principalmente da cerveja (LYVEN, 2016). Esta enzima foi descartada do processo por após 5,3 h não demonstrar alterações no pH, ou seja, não houve atividade enzimática. Isto se explica por esta enzima não ser indicada para proteínas lácteas.

Foi atribuída então uma nova hidrólise enzimática combinando as enzimas Neutrase (endoprotease) e Alcalase (exoprotease). A premissa adotada foi de que a Alcalase atua nas regiões internas das cadeias polipeptídicas, quebrando as ligações com resíduos de aminoácidos aromáticos, ácidos, sulfurados, alifáticos, hidroxil e básicos no lado carboxílico. Já a Neutrase, atua nas regiões externas, quebrando as ligações restantes de carboxi-terminais (aminoácidos aromáticos) e também em aminoácidos hidrofóbicos e alifáticos.

O grau de hidrólise com média e Desvio Padrão (DP) obtido neste trabalho, aliando as melhores enzimas, está demonstrado na Figura 12.

Figura 12: Grau de hidrólise sequencial das proteínas do buttermilk utilizando a Alcalase seguida de Neutrase



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

A alcalase tem especificidade principalmente para aminoácidos hidrofóbicos, enquanto a Neutrase tem especificidade principalmente para leucina e fenilalanina (Kunst 2003).

Aliando as duas enzimas com mecanismos de ação diferentes, conseguimos obter um GH significativo, atingindo o seu máximo em 34 %. Como já citado anteriormente, as exopeptidases catalisam a quebra das ligações peptídicas nas extremidades N ou C terminal das cadeias polipeptídicas, já endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas.

A degradação do colágeno por metaloprotease (neutrase) começa a partir do exterior. A enzima se liga firmemente a uma tripla hélice na superfície das moléculas,

ocorrendo a degradação progressiva no exterior. Após a tripla hélice começa a mudar, seus fragmentos primários são clivados em pequenos peptídeos e aminoácidos. (DAMRONGSAKKUL et al., 2008).

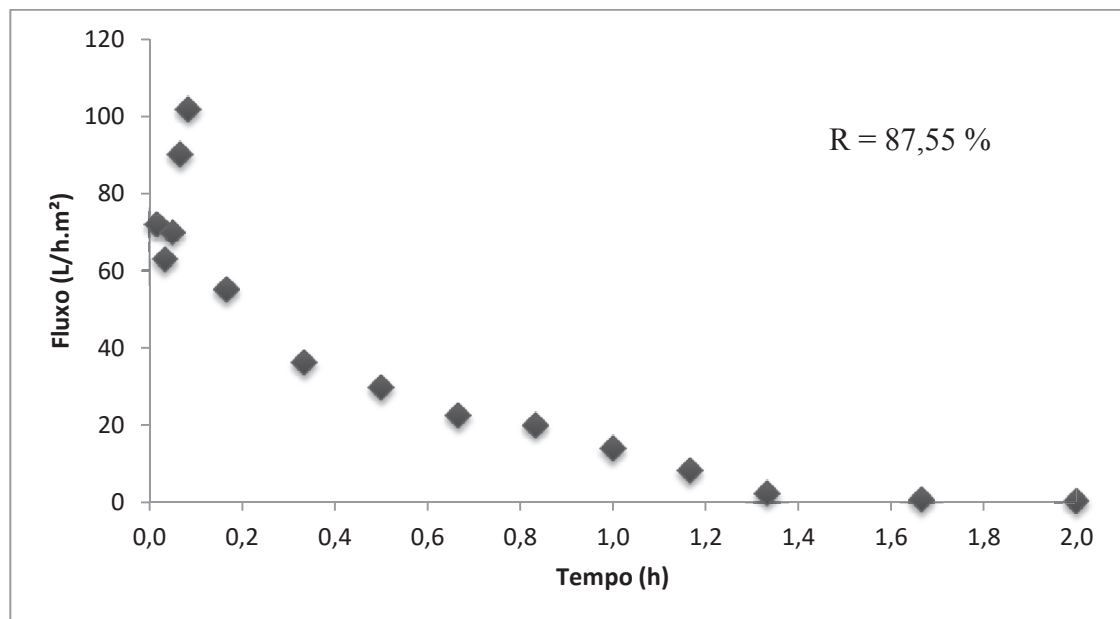
Otte et al. (1997) testaram várias proteases na hidrólise de β -Lg, entre elas: bromelina, tripsina, endoproteinase, aminopeptidase e carboxipeptidase. As condições padrões de hidrólise foram 37°C e pH 8, exceto para carboxipeptidase (pH 6,5). A β -Lg foi degradada rapidamente onde obtiveram peptídios de tamanho médio (1-5 kDa) e GH de 49 %.

Alguns peptídeos inibidores da ECA derivados da caseína bovina foram produzidas por hidrólise enzimática com várias proteases, como a tripsina (MARUYAMA et al. 1987), Flavourzyme, e Neutrase (MIZUNO et al. 2004), pepsina e tripsina (PIHLANTO-LEPPÄLÄ et al. 1998). Neutrase e papaína apresentaram as maiores atividades após 30 min de hidrólise entre todas as enzimas. Os hidrolisados derivados de flavourzyme mostraram a menor atividade inibitória da ECA.

4.3 PRODUÇÃO DOS PEPTÍDEOS NO BIORREATOR A MEMBRANA

A Figura 13 apresenta o fluxo permeado quando ultrafiltrou-se o buttermilk sem hidrólise. Esse experimento foi realizado como testemunha do processo, para a comparação da UF do hidrolisado.

Figura 13: Fluxo de permeado durante a filtração do *buttermilk* com membrana de ultrafiltração à temperatura de 50°C e pressão de 1bar



Fonte: elaborado pelo Autor (2019)

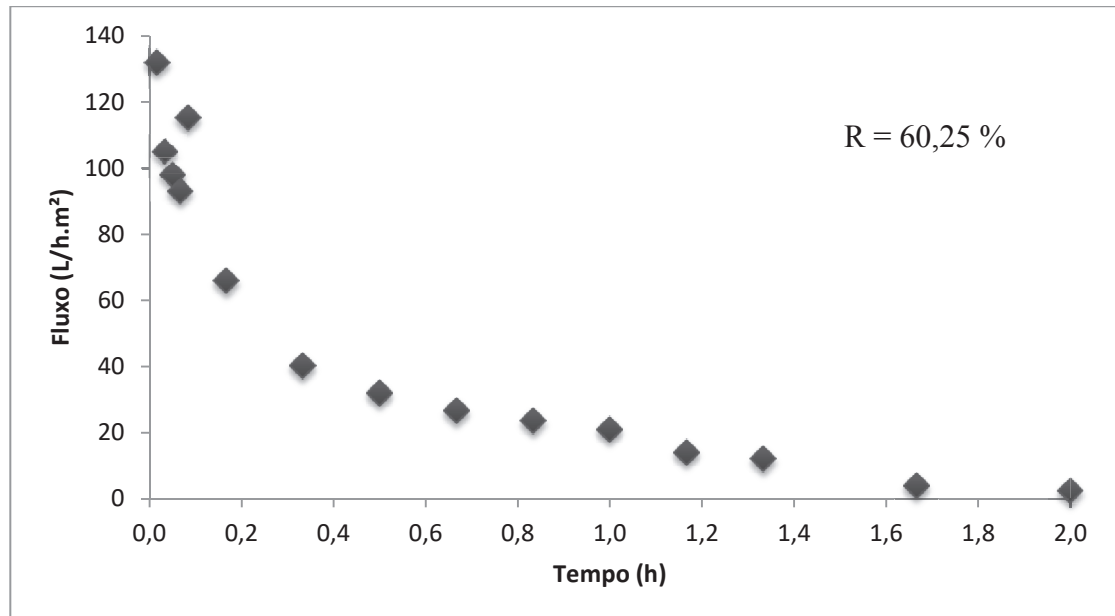
A pressão definida para filtração foi de 1 bar. Segundo Verdi (2017), o modelo de ajustes dos pontos é polinomial, e até a pressão de 1 bar o fluxo mostra dependência mais linear com a pressão, ou seja, fenômenos como polarização e incrustação são minimizados. Por este motivo, esta pressão foi definida 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.

É possível observar que o fluxo máximo atingido chegou a 112,6 L/h.m², havendo um forte decréscimo e atingindo 0,4 L/h.m² após 2 h, indicando o fenômeno de incrustação e colmatação da membrana.

A rejeição (R) de proteínas do buttermilk pela membrana de UF chegou a 87,55 %. A rejeição não foi total, pois proteínas presentes com peso molecular < 30 kDa, permeiam os poros da membrana. Leindecker (2011), comprova que a membrana UF de massa molar de corte de 10 kDa apresenta a maior retenção de proteínas comparada com membranas de 30 e 50 kDa. Atrá et al. (2005) utilizaram uma membrana com menor massa molar de corte (6-8 kDa) e uma pressão de 1 bar, atingindo rejeições de proteína de 92-98 % quando ultrafiltraram proteínas do soro de leite. Diferentes tipos de *buttermilk* possuem variações em sua composição o que pode levar a pequenas diferenças de rejeições. No entanto, a alta rejeição das proteínas do buttermilk pela membrana mostram que elas possuem maior peso molecular, havendo a oportunidade para serem hidrolisadas e produzir peptídeos com bioatividade.

A Figura 14 apresenta o fluxo permeado quando ultrafiltrou-se o *buttermilk* com hidrólise das enzimas Alcalase e Neutrase.

Figura 14: Fluxo de permeado durante a filtração do *buttermilk* hidrolisado com Alcase + Neutrase com membrana de ultrafiltração à temperatura de 50°C e pressão de 1bar



Fonte: elaborado pelo Autor (2019)

O fluxo máximo atingido chegou a 132,5 L/h.m², tendo decréscimo significativo e atingindo 0,5 L/h.m² indicando o fenômeno de incrustação e o término do processo.

A rejeição (R) de proteínas pela membrana de UF foi de 60,25 %. Demonstrando maior permeação das proteínas pela membrana, fato ocorrido pela redução do tamanho molecular das proteínas do *buttermilk* pelo processo de hidrólise enzimática.

No processo de hidrólise, ocorre também o aumento do tamanho de partícula, atribuído à reação de agregação protéica induzida por enzimas no início da hidrólise péptica (LORENZEN SCHLIMME, 1991; MUDGAL et. al., 2011), ocasionando em tamanhos moleculares maiores, dificultando a permeabilidade. Demonstrando que embora a rejeição tenha sido menor comparada à rejeição com o *buttermilk* não hidrolisado, seu valor ainda está elevado.

O fluxo inicial de permeado foi de 132,5 L/hm² e foi superior ao fluxo de permeado não hidrolisado apresentado na Figura 13 (112,6 L/h.m²), indicando que a hidrólise reduziu o tamanho das proteínas, mesmo nos primeiros minutos da reação. Cheison, Wang e Xu (2007), também encontraram resultados, 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 aumenta a permeação do produto.

A presença de sólidos na solução de alimentação (*buttermilk*) ocasionou a redução do fluxo à medida que o volume de permeado foi coletado aumentando a concentração dos

sólidos no rejeito. Segundo Leindecker (2011), as quedas dos fluxos são normais devido à formação da camada de polarização por concentração, o *fouling* (acúmulo de matérias depositadas na membrana durante a fase de polarização da concentração, também chamado de colmatação da membrana) e ao aumento da concentração da solução.

Essa queda de fluxo ocasionada pelo *fouling* geralmente é inevitável, sendo necessário interromper o processo para proceder a uma limpeza com agentes químicos (MARSHALL; DAUFIN, 1995).

Segundo Rao (2002) e Rice et al. (2009), a presença do cálcio influencia na colmatação da membrana pela sua deposição direta na forma de sais de cálcio e sua interação com as proteínas. E segundo eles, quase todos os constituintes do *buttermilk* podem ser responsáveis, em alguma extensão, pelo *fouling* da membrana durante a ultrafiltração.

A estabilidade do fluxo em 2 horas de operação justificou a interrupção do processo.

4.3.1 Avaliação do processo

Para avaliação do processo, fez-se a análise das composições (proteína, gordura e lactose), nas correntes de permeado e retido obtidas pelo processo de filtração, antes e após o processo de hidrólise enzimática. Nas Tabelas 6 e 7 podemos observar as comparações entre as mesmas correntes com e sem o processo de hidrólise, após a filtração por membrana de UF.

Tabela 5: Comparação das composições da corrente de permeado antes e após o processo de hidrólise enzimática

| Composição (%) | Alimentação (%) | Permeado (%) | Permeado Hidrolisado (%) |
|----------------|-----------------|------------------------|--------------------------|
| Protéina | 2,08±0,03 | 0,93±0,08 ^a | 1,28±0,09 ^b |
| Lactose | 1,76±0,04 | 0,91±0,09 ^a | 0,94±0,08 ^a |
| Gordura | 2,43±0,09 | 0,23±1,03 ^a | 0,24±0,08 ^a |

* 1. Resultados de média ± desvio padrão; letras diferentes em uma mesma linha correspondem à diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey;

Fonte: elaborado pelo Autor (2019)

Tabela 6: Comparação das composições da corrente de retido antes e após o processo de hidrólise enzimática

| Composição (%) | Alimentação (%) | Retido (%) | Retido Hidrolisado (%) |
|----------------|-----------------|------------------------|------------------------|
| Protéina | 2,08±0,03 | 1,08±1,08 ^a | 0,78±1,02 ^b |
| Lactose | 1,76±0,04 | 0,62±1,12 ^a | 0,59±0,09 ^a |
| Gordura | 2,43±0,09 | 2,12±0,98 ^a | 2,18±0,05 ^a |

* 1. Resultados de média \pm desvio padrão; letras diferentes em uma mesma linha correspondem à diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey;

Fonte: elaborado pelo Autor (2019)

A composição de proteína na alimentação foi distribuída pelas correntes de permeado e retido, tendo maior concentração na corrente de permeado após o processo de hidrólise, fenômeno já esperado pela redução do seu tamanho molecular. Já na corrente de retido, percebe-se que o teor de proteína reduziu após o processo de hidrólise, comprovando também uma maior permeação das proteínas do *buttermilk* pela membrana.

Barry et. al., (2017) hidrolisaram o *buttermilk* combinando Neutrase e Alcalase e apenas Alcalase visando determinar a enzima proteolítica de melhor ação enzimática. Os autores concluíram que um GH de 19 % digere proteínas do *buttermilk* suficientemente para permitir a permeação através de uma membrana de UF de 50 kDa, a membrana do tipo cartucho com um peso molecular nominal de 50 kDa permitiu a permeação máxima do material proteico digerido.

Ainda segundo a autora, ao contrário de pesquisadores anteriores que utilizaram MF em suas separações, a combinação da filtração por membrana de UF e hidrólise do *buttermilk* permitiu a obtenção de fosfolipídeos de modo satisfatório.

A filtração do *buttermilk* pode ser desafiadora devido à gordura residual e fragmentos de MFGM de vários tamanhos de partículas. (Fauquant et al., 2014). Os glóbulos de gordura são cobertos por sua membrana biológica nativa, ou seja, a MFGM, contendo domínios ricos em esfingomiélin circundados por uma matriz de glicerofosfolipídios integrando proteínas de membrana como revelado em (Lopez et al., 2010). As proteínas do leite (por exemplo, caseínas e proteínas do soro do leite) são dispersas na fase aquosa que envolve os glóbulos de gordura nativos. Parte das proteínas permanece na fase aquosa em torno dos glóbulos de gordura, enquanto algumas proteínas formam uma camada densa adsorvida no núcleo triacilgliceróis dos glóbulos de gordura, indicando a composição interfacial de glóbulos de gordura do leite homogeneizado.

Percebe-se que os resultados para lactose e gordura em ambos os casos foram semelhantes. Pelo diâmetro de corte da membrana, o teor máximo de gordura deveria permanecer no retido, porém uma pequena fração esteve presente no permeado. Uma explicação possível é que a gordura remanescente no *buttermilk* tivesse um maior teor de gordura livre (Mulder e Walstra, 1974). Portanto, mais gordura foi transferida através da membrana. A gordura livre não pode ser separada por desnatadeiras e as moléculas são provavelmente muito pequenas para serem retidas pelas membranas de UF.

Roesch e Corredig (2002) obtiveram um aumento lipídico total de 8 % a 16 % no retentado final após hidrólise por UF enquadrando os valores deste estudo.

Temperaturas de filtração mais baixas parecem ter impacto negativo no desempenho de separação (Astaire et al., 2003 , Morin et al., 2006). As temperaturas durante as filtrações neste estudo foram todas acima de 40 °C. Sabe-se que a temperatura de filtração influencia a transmissão de proteínas sobre a membrana de UF. Morin et al. (2004) descobriram que as transmissões de proteínas e lipídios totais foram maiores em temperaturas altas e intermediárias de 50 e 25 ° C. No entanto, Morin et al. (2007) relataram que os processos de tratamento térmico do *buttermilk* e creme foi o fator tecnológico mais importante que afetou o isolamento de componentes MFGM por tecnologia de filtração. Por esta razão, o isolamento de componentes MFGM do *buttermilk* usando filtração por membrana poderia ser melhorado se a desnaturação por calor das proteínas, possivelmente, os componentes da membrana MFGM, fosse reduzido pelo uso de condições de pasteurização menos duras do creme na indústria.

Segundo Ye et al. (2002), do ponto de vista industrial, a diversidade no tratamento de nata e manuseio do *buttermilk* leva a uma maior variedade na composição e nas suas propriedades funcionais. Para otimizar a utilização da fração protéica do soro da manteiga, o tratamento com creme e o manuseio do *buttermilk* devem ser padronizados entre os produtos lácteos, e o tratamento térmico deve ser controlado e documentado.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

4.4.1 Comprimento médio da cadeia e da massa molecular média

A Tabela 7 apresenta o comprimento médio das cadeias e a massa molecular média dos peptídeos produzidos pela hidrólise enzimática do *buttermilk* utilizando Neutrase e Alcalase. Os resultados referentes às outras enzimas encontram-se no Apêndice C.

Tabela 7: Caracterização molecular do hidrolisado obtido com Alcalase e Neutrase

| Tempo (h) | Média (GH) | Comprimento médio das cadeias (Nº de resíduos) | Massa molecular média (Da) |
|-----------|------------|--|----------------------------|
| 0,2 | - | - | - |
| 0,3 | 1,9 | 52,632 | 6320 |
| 0,5 | 2,5 | 40,000 | 4800 |
| 0,7 | 3,2 | 31,250 | 3750 |
| 0,8 | 4,57 | 21,882 | 2620 |
| 1,0 | 5,68 | 17,606 | 2110 |
| 1,2 | 7,20 | 13,889 | 1670 |
| 1,3 | 9,20 | 10,870 | 1300 |
| 1,5 | 12,90 | 7,752 | 930 |
| 1,7 | 15,84 | 6,313 | 760 |
| 1,8 | 17,20 | 5,814 | 700 |
| 2,0 | 20,50 | 4,878 | 580 |
| 2,2 | 23,80 | 4,202 | 500 |
| 2,3 | 25,30 | 3,953 | 470 |
| 2,5 | 28,22 | 3,543 | 420 |
| 2,7 | 30,18 | 3,313 | 400 |
| 2,8 | 30,20 | 3,311 | 3970 |
| 3,0 | 30,73 | 3,254 | 390 |
| 3,2 | 32,13 | 3,112 | 373 |
| 3,3 | 32,42 | 3,084 | 370 |
| 3,5 | 33,06 | 3,024 | 362 |
| 3,7 | 33,45 | 2,989 | 358 |
| 3,8 | 33,62 | 2,974 | 356 |
| 4,0 | 33,82 | 2,956 | 354 |
| 4,2 | 34,01 | 2,940 | 352 |
| 4,3 | 34,02 | 2,939 | 352 |

Fonte: Elaborado pelo Autor (2019)

As proteínas são polímeros construídos a partir de um conjunto de 20 α -aminoácidos (variando em tamanho, polaridade e propriedades ácido-base), onde o grupamento α -carboxílico de um aminoácido se une ao grupamento α -amino de outro aminoácido por meio de uma ligação amida (ligação peptídica), ocorrendo a condensação de uma molécula de água (STRYER, 1992, KENNEDY, 1987). Polímeros compostos por dois, três, poucos (aproximadamente de 3 a 10) e muitos aminoácidos são conhecidos, respectivamente, como dipeptídios, tripeptídios, oligopeptídios e polipeptídios. Observa-se que após 4 h de hidrólise, o peso molecular estimado é de apenas 352 Da.

Os di e tripeptídeos possuem massa molecular média menor que 500 Da (0,5 kDa), os polipeptídios possuem de 40 a mais de de 4.000 resíduos de aminoácidos e têm massa molecular de em torno de 4 a acima de 440 kDa (VOET, 1995).

Percebe-se pela Tabela 5, um decréscimo progressivo no comprimento das cadeias e na massa molecular média à medida em que o GH aumenta. O CMC final de 2,939 indica que, em média, os peptídeos formados são di e tripeptídeos. Guadix et al. (2006) relatam resultados para soro de leite 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 1 kDa. Perea e Ugalde (1996), também para soro de leite, 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 1 kDa.

Não é desejável que o hidrolisado contenha somente aminoácidos livres, pois estes podem tornar uma dieta hiper-osmótica, causando secreção intestinal e diarreia. Além disso, uma mistura composta por di e tripeptídios seria mais bem absorvida no intestino do que uma mistura de aminoácidos livres, por evitar competição entre aminoácidos que compartilham o mesmo mecanismo de transporte (GONZÁLEZ-TELLO et al., 1994). Assim, fórmulas contendo pequenos peptídios são usadas mais eficientemente do que uma mistura de aminoácidos livres e têm maior valor nutritivo (SILVESTRE et al., 1994).

Para a caseína, os tripeptídeos VPP e IPP possuem atividade de inibição da ECA como também são imunomodulatórios. O efeito no sistema imune é devido a via das bradicininas, que uma vez inibindo a ECA a bradicinina poderá estimular (ou recrutar) macrófagos e a secreção de linfocinas (proteína de secreção dos linfócitos) (PESSIONE e CIRRINCIONE, 2016).

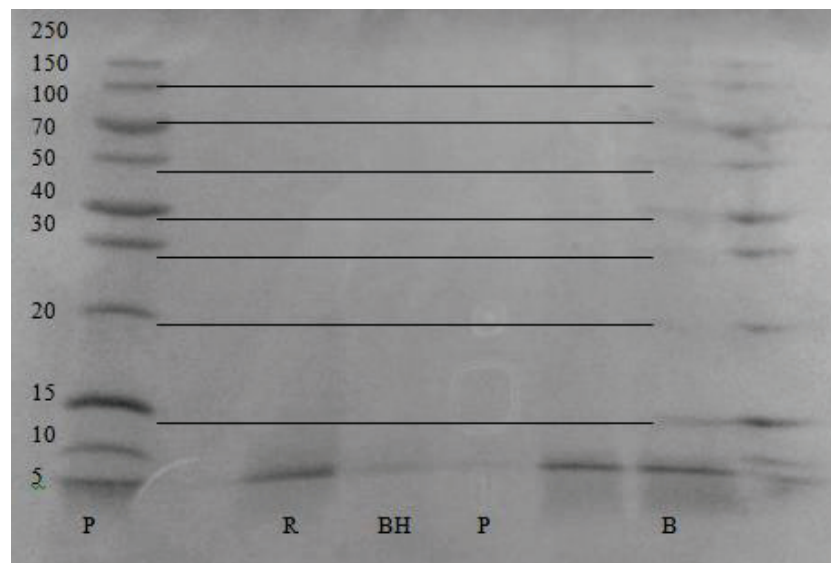
O sabor amargo de hidrolisados protéicos é influenciado pelo tamanho dos peptídios (ADLER-NISSEN, 1986; KUKMAN et al., 1995; HOSSAIN E STANLEY, 1996). Tem-se relatado que peptídios contendo de 3 a 15 resíduos de aminoácidos são amargos (PAWLETT e BRUCE, 1996) e que para se evitar o aparecimento de sabor amargo, os peptídios deveriam ter uma massa molecular acima de 6 kDa (KUKMAN et al., 1995; ADLER-NISSEN, 1986). Entretanto, peptídios com essa massa molecular já poderiam acarretar problemas alergênicos, pois tem sido verificado que este efeito praticamente desaparece quando os peptídios têm massa molecular menor que 2 kDa (GONZÁLEZ-TELLO et al., 1994). Portanto, para se obter hidrolisados compostos basicamente por di e tripeptídeos, sem sabor amargo, seria necessária a separação dos peptídios hidrofóbicos amargos, o que por sua vez acarretaria uma diminuição acentuada no seu valor nutricional, ao se eliminar também outros resíduos presentes no

peptídio. Uma alternativa seria a redução somente dos aminoácidos aromáticos, que pode melhorar o sabor dos hidrolisados enzimáticos (ADLER-NISSEN, 1986; ADACHI et al., 1991), podendo ser utilizados para fins alimentícios. Além do que, a redução ou eliminação do conteúdo em fenilalanina (aminoácido aromático) forneceria um produto de alto valor agregado, pois seria de pronto uso por portadores de fenilcetonúria, cujo único tratamento é a restrição dietética deste aminoácido.

4.4.2 ELETROFORESE

Para avaliar o tamanho molecular dos peptídeos obtidos, as amostras de *buttermilk*, *buttermilk* hidrolisado, permeado foram submetidas a eletroforese e são analisadas na Figura 15.

Figura 15: Perfil eletroforético das amostras em gel Tris-Tricina.



Legenda: Primeira banda: perfil eletroforético do padrão (2 a 250 kDa) – (P); Segunda banda: desconsiderado; Terceira banda: perfil eletroforético do retido – (R); Quarta banda: perfil eletroforético do *buttermilk* hidrolisado - (BH); Quinta banda: perfil eletroforético do permeado – (P); Sexta banda: desconsiderado; Sétima banda: perfil eletroforético do *buttermilk* - (B).

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

Podemos observar o perfil eletroforético do *buttermilk* (B) como referência. A amostra sem sofrer processo de hidrólise apresenta variações de tamanhos moleculares entre 13 e 130 kDa (a primeira marcação de 5 kDa é desconsiderada). Abdelmoneim et. al., (2018) encontraram valores próximos e explicou as diferenças moleculares da seguinte forma: α -lactoglobulina entre 10 a 15 kDa; β -lactoglobulina entre 15 e 20 kDa; Caseínas (β , α , e κ)

entre 20 e 40 kDa e acima de 50 kDa proteínas do MFGM (butirofilina, xantina oxidase e desidrogenase).

A butirofilina é uma glicoproteína que representa mais de 40 % da massa de proteínas totais da MFGM. Já a xantina oxidase representa 12 % da massa de proteínas totais.

A banda eletroforética B mostra que apenas a proteína do *buttermilk* continha as proteínas MFGM. Após a hidrólise enzimática, as proteínas e caseínas derivadas de MFGM foram lizadas em todas as amostras. Todas as proteínas que foram hidrolisadas apresentaram peptídeos menores que 5 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).

Sabadin, Villas-Boas, Zollner et al. (2012) relataram peptídeos de MM menor que 6,5 kDa em hidrolisados de β -Lg produzidos com Alcalase livre que apresentaram cerca de 12 % de GH. Doucet, Otter, Gauthier (2003) relataram formação de peptídeos menores que 2 kDa a partir da hidrólise com Alcalase por 5 h, valores semelhantes aos encontrados neste trabalho.

Schmidt e Poll, (1991) não observaram nenhuma proteína intacta após 30 min de hidrólise. Segundo os autores, no início formam-se alguns peptídeos grandes que desaparecem rapidamente e após 4 h somente peptídeos pequenos são detectados.

Perea et al. (1993) utilizaram Alcalase 0,6L para a digestão de proteínas do soro, a 55°C (pH 8,5), 4 horas de reação. A degradação proteolítica de α -La e β -Lg resultou inicialmente em produtos com 6 kDa e 2,5 kDa, sendo formados peptídios com massa molecular menor que 1 kDa ao se atingir um grau de hidrólise em torno de 22 %. Hidrólises com outras endopeptidases, de origem bacteriana ou animal, resultaram em frações de peptídios (61 a 67 %) com massa molecular menor que 1 kDa e frações (30 a 35 %) com massa molecular entre 1 e 3 kDa.

A escolha da enzima afeta a atividade inibitória da ECA do hidrolisado proteico e da forma do peptídeo ativo devido às especificidades da enzima. O peso molecular dos peptídeos inibidores da ECA é maioritariamente menor que 3 kDa (ABUBAKAR et al. 1998; PIHLANTO-LEPPÄLÄ et al. 1998; HAILESELASSIE et al. 1999; YAMAMOTO et al. 1999; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al. 2002, 2004; ROBERT et al. 2004).

4.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS HIDROLISADOS PROTEICOS PRODUZIDOS

4.5.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos peptídeos está demonstrada em $\mu\text{mol TE/g}$ de proteína e % de inibição, conforme mostra a Tabela 8. As amostras hidrolisadas mostraram aumento na AA quando comparadas com o *buttermilk* não hidrolisado ($43,7 \mu\text{mol TE/g}$ e $5,34 \%$ de inibição), exceto a enzima Lypaine, a qual não apresentou nenhuma atividade enzimática e teve resultados quase idênticos ao *buttermilk* não hidrolisado ($38,99 \mu\text{mol TE/g}$ e $4,89 \%$ de inibição). Os resultados foram comparados com amostras líquidas e amostras em pó, liofilizadas. As amostras líquidas foram diluídas nove vezes para leitura na curva, já as amostras liofilizadas foram diluídas 50 vezes e apresentaram valores superiores em todos os casos quando comparadas às amostras líquidas, como mostra o Apêndice D.

Tabela 8: Atividade antioxidante das amostras expressa por $\mu\text{mol TE/g}$ de proteína e % de inibição.

| Unidade | Amostras | | | | | | | |
|----------------------|-------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | <i>Buttermilk</i> | Alcalase | Neutrase | Prolyve | Lypaine | Al + N | Al + N (P) | Al + N (R) |
| $\mu\text{mol TE/g}$ | $43,7 \pm 2,40^a$ | $290,01 \pm 7,08^c$ | $63,85 \pm 3,27^b$ | $266,46 \pm 3,72^c$ | $38,99 \pm 7,42^a$ | $370,27 \pm 2,78^d$ | $427,98 \pm 0,91^e$ | $342,63 \pm 4,92^d$ |
| % de inibição | $5,34 \pm 0,71^a$ | $28,82 \pm 0,54^c$ | $7,23 \pm 0,70^b$ | $26,47 \pm 0,55^c$ | $4,89 \pm 0,72^a$ | $36,48 \pm 0,48^d$ | $41,97 \pm 0,44^c$ | $33,83 \pm 0,50^d$ |

* I. Resultados de média \pm desvio padrão; letras diferentes em uma mesma linha correspondem à diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey; Legenda: Al + N: alcalase + neutrase; Al + N (P): alcalase + neutrase permeado; Al + N (R): alcalase + neutrase retido.

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

A hidrólise efetiva aumentou a atividade antioxidante e a eliminação do radical livre em todos os casos. Os maiores valores obtidos foram para o *buttermilk* hidrolisado com Alcalase e Neutrase, a mesma amostra passando pelo processo de filtração (permeado e retido), ficando entre 800 a $1000 \mu\text{mol TE/g}$ de proteína e entre 70 a 90% de inibição. Youg et. al., (2011) encontraram valores próximos para o *buttermilk* após hidrólise da Alcalase por 5 horas, $554,4$ a $1319,6 \mu\text{mol TE/g}$ de proteína. Os autores explicam que o desdobramento da estrutura proteica dos

aminoácidos expostos, anteriormente indisponível na estrutura da proteína nativa, resulta em um aumento geral da atividade antioxidante.

A atividade antioxidante de diferentes frações do leite e derivados foi relatada. Conway et al. (2013) mostraram que proteínas concentradas de *buttermilk* exerceram maior eliminação de radicais livres e atividade do que as proteínas do soro de leite e leite. Em outro estudo, o efeito antioxidante do *buttermilk* tem sido atribuído à sua capacidade de sequestrar Fe^{2+} e Fe^{3+} e eliminar o radical hidroxila (WONG e KITTS, 2003).

Como o Fe^{2+} e Fe^{3+} são a forma reduzida e biologicamente ativa de ferro e estão envolvidos em muitas reações de oxidação de nutrientes alimentares, a afinidade do *buttermilk* em ligar o Fe^{2+} e Fe^{3+} é fundamental para o seu uso como alimento antioxidante de qualidade. Vários pesquisadores investigaram a capacidade de caseína e soro de leite para ligar Fe^{3+} (BASCH et al., 1970; DEMOTT e PARK, 1974; DEMOTT e DINCER, 1976; HEKMAT e MCMAHON, 1998; MCMAHON e BROWN, 1984). Vaughan e Knauff (1961) mostraram a afinidade relativa do Fe^{3+} com as proteínas do leite na ordem de, α S1 - caseína > β caseína > de soro bovino albumina > κ -caseína > β -lactoglobulina > α -lactalbumina.

Para Colbert e Decker 1989, a atividade antioxidante do *buttermilk* hidrolisado, calculado a partir da diferença entre a absorvância controle e tratamento, expresso em porcentagem de inibição foi de 55,96 e 60,64 %. Thompkin-filho e Mathur (1989) encontraram uma atividade antioxidante expressa em porcentagem de inibição de 12,22 % para o *buttermilk*, valor próximo ao encontrado neste trabalho.

O aumento do teor de gordura do leite aumenta sua atividade antioxidante (Chen et al., 2003), o que se deve ao maior valor em material MFGM.

Conforme confirmado pela eletroforese, o *buttermilk* continha grandes quantidades de proteínas de MFGM. Britten et al. (2012) relataram que as proteínas MFGM são responsáveis por até 20 % da proteína total no *buttermilk*. Chen et al. (2008) sugeriram a contribuição dessas proteínas para a capacidade antioxidante. Além disso, o *buttermilk* é conhecido por seu alto teor de lipídios polares comparado ao leite desnatado (2,03 vs 0,28 %, na base de matéria seca) que também são precursores da atividade antioxidante. Também segundo os autores, peptídeos originários das principais proteínas do soro de leite (α -lactalbumina e β -lactoglobulina) são responsáveis também pela atividade antioxidante.

As proteínas lácteas (MFGM) menores são compostas por um grupo muito diversificado de proteínas representado predominantemente por butirofilina, xantina desidrogenase / oxidase, grupo de diferenciação, ácido periódico Shiff III (PAS III),

adipofilina, proteína de ligação a ácidos graxos, e ácido periódico Schiff 6/7. A butirofilina é a principal fonte dos peptídeos identificados por eletroforese em proteínas de *buttermilk* hidrolisado, representando 20 de 48. Além disso, as porcentagens de inibição desses peptídeos variam de 38,1 a 61,5 % (SINGH et. al., 2006).

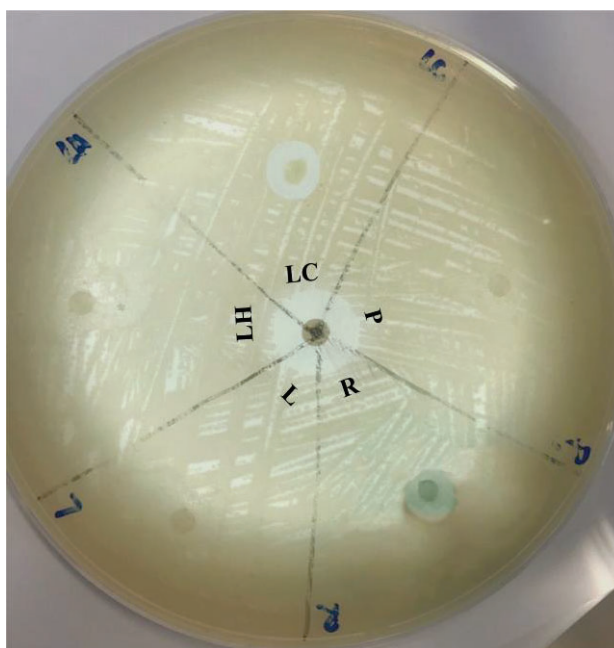
Alguns autores associaram a atividade antioxidante dos hidrolisados de proteínas de *buttermilk* com peptídeos de baixa massa molecular e aminoácidos livres (CONTRERAS, et. al., 2011; POWER et. al., 2013). Kim et al. (2007) relataram uma degradação completa das α -lactalbumina, β -lactoglobulina dentro de 60 minutos após a hidrólise com Alcalase.

As caseínas são mais antioxidantes que as proteínas do soro de leite, provavelmente devido à sua capacidade em sequestrar ferro e pelos resíduos de fosfoseril na superfície das micelas de caseína (RIES et. a., 2010).

Peng et al. (2009) indicaram que peptídeos com massa molecular entre 0,1 e 2,8 kDa foram os principais peptídeos responsável pela atividade antioxidante dos hidrolisados obtidos com Alcalase de isolados de *buttermilk*. Os resultados deste trabalho estão de acordo com essa observação, uma vez que as amostras de *buttermilk* submetidas à hidrólise apresentaram valores abaixo de 5 kDa e maiores atividades antioxidantes.

4.5.2 Atividade antimicrobiana

Os efeitos antimicrobianos do *buttermilk* aumentam gradualmente com o aumento da sua concentração. Alcançando melhores resultados em altas concentrações (AGYEI e DANQUAH, 2011). Assim, foram usadas também amostras concentradas por liofilização, tendo em vista que testes preliminares com a amostra líquida, não apresentaram atividade antimicrobiana. Foram utilizadas a cepa Gram-negativa, *Eschehria coli* e Gram positiva *Staphylococcus aureos*, e percebido indício de atividade antimicrobiana apenas para a Gram-negativa *E.coli*, como mostra a Figura 16.

Figura 16: Análise antimicrobiana com a cepa de *E. coli*

Legenda: LC - *Buttermilk* concentrado; P - Permeado; R - Retido; L - *Buttermilk*; LH - *Buttermilk* Hidrolisado.

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019

A lactoferrina é extensivamente estudada por sua atividade antimicrobiana. A lactoferrina tem um pI alto de 8,7, com cerca de 35 % de peptídeos catiônicos ($pI > 9$) (CHAN e LI-CHAN (2007).

O aumento da produção do ácido lático através da fermentação reduz o pH do meio, que é conhecido por inibir o crescimento da maioria dos microrganismos patógenos. O efeito antimicrobiano também se deve à forma não dissociada do ácido e sua capacidade em reduzir o pH intracelular, levando à inibição das funções das células vitais. Diferentes sensilidades dos microrganismos determina diferentes zonas de inibição no mesmo pH. (KIVANÇ at. Al., 2011).

Apenas o *buttermilk* concentrado apresentou Halo de inibição, comprovando a colocação dos autores Agyei e Danquah (2011), onde se é necessária a concentração deste. Com Halo de inibição baixo de 10 mm (7 mm), não pode ser considerado como antimicrobiano. Embora não foi possível classificá-lo como produto antimicrobiano, comprovou-se que o *buttermilk* possui potencial para este fim, sendo necessários maiores estudos.

Existem vários trabalhos (DABÉS et al., 2001; ALEXANDRE et al., 2002; MARTINS et al., 2006; PEREIRA & GÓMEZ, 2007; BELGACEM et al., 2010) que tratam da atividade antimicrobiana exercida pelas BAL, bem como da produção de peptídeos biologicamente ativos. Alexandre et al. (2002) isolaram 192 linhagens de BAL de cinco amostras de queijo minas artesanal, sendo que 48 destas cepas isoladas (25 %) foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de microrganismos indicadores, dentre os quais *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Pereira & Gómez (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana, pelo teste de multicamadas e difusão em ágar, do *Lactobacillus acidophilus* La5, frente ao crescimento de dois microrganismos patogênicos veiculados por alimentos, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os melhores resultados de inibição foram obtidos pelo método de difusão em ágar, com halos de inibição de 14,75 mm e 15,0 mm de diâmetro para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente.

A atividade contra patógenos Gram-positivos deve-se principalmente ao efeito bactericida das bacteriocinas sensíveis à protease, (DE VUYST et al., 2007; ATANASSOVA et al., 2003), enquanto o efeito antagônico sobre patógenos Gram-negativos podem estar relacionados à produção de ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio. (MARKRAS et al., 2006)

As bactérias podem usar vários mecanismos de defesa contra peptídeos microbianos (JOO e OTTO, 2015), incluindo a produção de proteases segregadas, a modificação de lipopolissacarídeo e membranas para reduzir sua carga superficial negativa e secreção de partículas negativas exopolissacarídeos carregados, como o ácido colônico, produzido por *E. coli* e *Salm. Typhimurium* (FOSCHIATTI et al. 2009).

Algumas bacteriocinas BAL foram ativas contra *E. coli* e *Salmonella typhimurium*. após a liofilização, mas por outro lado, a resistência contra antibióticos Gram-negativos, a canamicina e a estreptomicina são frequentemente observados em lactobacilos e bifidobactérias (GONG et al., 2010; SIMOVA et al., 2006). Isso pode ser explicado pela alta taxa de espontaneidade de mutações cromossômicas que transmitem resistência a esses antibióticos (DANIELSEN et al., 2003).

Yamauchi et al. (2012), demonstraram que a lactoferricina B (Lf-cin B) provavelmente danifica a membrana externa das bactérias Gram-negativas. Pensa-se que o principal efeito da Lf-cin B seja na membrana citoplasmática, tornando-a mais permeável. A concentração de Lf-cin B necessária para inibir e matar as bactérias sensíveis é alto, indicando que a inibição não ocorre em todos os ambientes fisiológicos. Bellamy et al. (2013),

descobriram que a Lf-cin B retinha sua atividade contra *E. coli*, e que um fragmento de Lf-cin B consiste em 11 aminoácidos.

5 CONCLUSÃO

Comprovou-se que a produção de peptídeos a partir do *buttermilk* em um biorreator a membrana é uma alternativa para seu aproveitamento, apresentando atividade antioxidante.

O processo de centrifugação anteriormente pré-definido como crucial, foi eliminado como pré tratamento.

A hidrólise com diferentes enzimas possibilitou a escolha de duas enzimas com características distintas (endo e exopeptidase), possibilitando um maior GH, chegando a 34 %, promovendo a conversão das moléculas de proteínas principalmente em di e tripeptídeos.

O BRM apresentou um fluxo inicial de permeado com *buttermilk* hidrolisado maior do que a permeabilidade inicial sem o processo de hidrólise, indicando que a hidrólise reduziu o tamanho das proteínas mesmo nos primeiros minutos de reação.

Pela eletroforese foi possível distinguir quais proteínas estavam presentes nas amostras analisadas, tendo a prevalência em di e tripeptídeos, comprovando também que tamanhos moleculares acima de 5 kDa foram encontrados apenas para o *buttermilk*, onde tamanhos moleculares abaixo de 5 kDa demonstram potencial bioativo.

Para a atividade antioxidante, percebeu-se que todas as amostras que passaram por processo de hidrólise efetivo, tiveram aumento para esta atividade. Sendo que os maiores valores foram obtidos pelo permeado concentrado por liofilização (amostra hidrolisada por Alcalase e Neutrase, permeada no processo de filtração por membranas e concentrada por liofilização). Esta mesma amostra, submetida apenas pelo processo de hidrólise e filtração, já apresentou ótimos valores para atividade antioxidante, comprovando a eficiência do processo de filtração por membranas.

Não foi possível comprovar a atividade antimicrobiana, chegando a alos de inibição menores que 10 mm, sendo necessários maiores estudos.

Sugestão para trabalhos futuros:

- Novos testes para análise antimicrobiana;
- Avaliar o amargor dos peptídeos;
- Caracterizar os peptídeos por MALDI-TOF.

REFERÊNCIAS

- ABUBAKAR, Amhar et al. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. **Journal of dairy science**, v. 81, n. 12, p. 3131-3138, 1998.
- ADAMSON, Nicholas J.; REYNOLDS, Eric C. Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: Determination of enzyme specificity. **Enzyme and microbial technology**, v. 19, n. 3, p. 202-207, 1996.
- 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.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). 2002. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. Brasil. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 05 de abril. 2019.
- AGYEI, Dominic; DANQUAH, Michael K. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 3, p. 272-277, 2011.
- 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.
- AKALIN, A. Sibel. Dairy-derived antimicrobial peptides: Action mechanisms, pharmaceutical uses and production proposals. **Trends in Food Science & Technology**, v. 36, n. 2, p. 79-95, 2014.
- ALEMÁN, Ailén et al. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 1044-1051, 2011.
- ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, p. 424-428, 2002.
- ALMEIDA, D. F.; SOUZA, A. B.; STEPHANI, R.; NEVES, H. C. Anuário de guia de referência do setor lácteo: ingredientes lácteos proteicos. **Leite & Derivados**, p. 14-16, mar./abr., 2014.

AMMOR, Mohammed Salim et al. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 14, n. 1-3, p. 6-15, 2008.

ANDRES, E.; DIMARCQ, J. L. Cationic antimicrobial peptides: update of clinical development. **Journal of internal medicine**, v. 255, n. 4, p. 519-520, 2004.

ANDREWS, A.T.; ALICHANIDIS, E. Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, n. 50, p. 275-290, 1983.

ANTUNES, A.J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. Barueri: Manole, SP, 2003.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis of AOAC international**. 16 ed., Arlington: AOAC International, 1995.

ARAUZ, Luciana Juncioni de. **Produção de nisina em leite desnatado diluído por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 em biorreator**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ARUNKUMAR, A.; ETZEL, M.R. Negatively charged tangential flow ultrafiltration membranes for whey protein concentration. **Journal of Membrane Science**, v. 475, p. 340–348, 2015.

ASHOK, Arpitha; BRIJESHA, N.; APARNA, H. S. Discovery, synthesis, and In vitro evaluation of a novel bioactive peptide for ACE and DPP-IV inhibitory activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 180, p. 99-110, 2019.

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

ASTAIRE, JC et al. Concentração de lipídios polares de MFGM a partir de *buttermilk* por microfiltração e extração com fluido supercrítico. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 7, p. 2297-2307, 2003.

ATANASSOVA, M. et al. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. **International journal of food microbiology**, v. 87, n. 1-2, p. 63-73, 2003.

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.

BARREIROS, L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.

BARRY, Kate M .; DINAN, Timothy G .; KELLY, Philip M. Produção em escala piloto de um ingrediente lácteo enriquecido em fosfolípidios por meio de um processo integrado otimizado empregando hidrólise enzimática, ultrafiltração e extração de fluido supercrítico. **Ciência Alimentar Inovadora e Tecnologias Emergentes** , v. 41, p. 301-306, 2017.

BARRY, Kate M. et al. Comparison of dairy phospholipid preparative extraction protocols in combination with analysis by high performance liquid chromatography coupled to a charged aerosol detector. **International dairy journal**, v. 56, p. 179-185, 2016.

BASCH, J. J. et al. Distribution of added iron and polyphosphate phosphorus in cow's milk. **Journal of dairy science**, v. 57, n. 5, p. 545-550, 1974.

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.

BELGACEM, Z. B.; ABRIOUEL, H.; OMAR, N. B.; LUCAS, R.; MARTINEZ-CANAMERO, M.; GALVEZ, A.; MANAI, M. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. **Food Control**, New York, v. 21, p. 462-470, 2010.

BERRA, B. et al. Dietary sphingolipids in colorectal cancer prevention. **European journal of cancer prevention**, v. 11, n. 2, p. 193-197, 2002.

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

BORGES, P.F.Z.; SGARBIERI, V.C.; DIAS, N.F.G.P.; JACOBUCCI, H.B.; PACHECO, M.T. B.; BALDINI, V.L.S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 4, n. 411, p. 1-8, 2001.

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.

BRITTEN, M.; LAMOTHE, S.; ROBITAILLE, G. Effect of cream treatment on phospholipids and protein recovery in butter-making process. **International journal of food science & technology**, v. 43, n. 4, p. 651-657, 2008.

BROMBERG, R., MORENO, I., DELBONI, R.R., CINTRA, H.C. **Characteristics of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 and its effect on *Listeria monocytogenes* in bovine meat**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, 135-144, 2006.

CAIS-SOKOLIŃSKA, D.; RUDZIŃSKA, M. Cholesterol oxidation products in traditional buttermilk. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 5, p. 3829-3834, 2018.

CERVATO, ROBERTA CAZZOLA, BENVENUTO CESTARO, Giovanna. Studies on the antioxidant activity of milk caseins. **International Journal of food sciences and nutrition**, v. 50, n. 4, p. 291-296, 1999.

CHAN, Judy CK; LI-CHAN, Eunice CY. Production of lactoferricin and other cationic peptides from food grade bovine lactoferrin with various iron saturation levels. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 2, p. 493-501, 2007.

CHARTERIS, William P. et al. Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli. **Journal of food protection**, v. 64, n. 12, p. 2007-2014, 2001.

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.

CHEN, Jun et al. Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. **International dairy journal**, v. 13, n. 12, p. 927-935, 2003.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and Microfiltration Handbook**. Technomic Publishing Co., Lancaster, PA, 2^a 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.

CHIANG, Shu-Hua; CHANG, Chi-Yue. Antioxidant properties of caseins and whey proteins from colostrums. **Journal of food and drug analysis**, v. 13, n. 1, 2005.

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

CICERO, A.; GEROCARNI, B.; LAGHI, L.; BORGHI, C. Blood pressure lowering effect of lactotripeptides assumed as functional foods: a meta-analysis of current available clinical trials. **Journal of Human Hypertension** v.25, p. 425, 2011.

CLARE, Debra A. et al. Antimicrobial properties of milkfat globule membrane fractions. **Journal of food protection**, v. 71, n. 1, p. 126-133, 2008.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, n.7, p.254-262. 2000.

CONTARINI, Giovanna; POVOLO, Milena. Phospholipids in milk fat: composition, biological and technological significance, and analytical strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 2808-2831, 2013.

CONWAY, V.; GAUTHIER, S. F.; POULIOT, Y. Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins, and their enzymatic hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p. 364–372, 2012.

CONWAY, V.; GAUTHIER, S. F.; POULIOT, Y. Effect of cream pasteurization, microfiltration and enzymatic proteolysis on in vitro cholesterol-lowering activity of buttermilk solids. **Dairy science & technology**, v. 90, n. 4, p. 449-460, 2010.

CONWAY, V.; GAUTHIER, S. F.; POULIOT, Y. Buttermilk: much more than a source of milk phospholipids. **Animal Frontiers**, v. 4, n. 2, p. 44-51, 2014.

CORREDIG, Milena; DALGLEISH, Douglas G. Production of a new ingredient of buttermilk. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2744 – 2750, 2003.

CORREDIG, Milena; DALGLEISH, Douglas G. Effect of heating of cream on the properties of milk fat globule membrane isolates. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2533-2540, 1998.

CORRÊA, Ana Paula Folmer et al. 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.

CORREDIG, M.; ROESCH, R. R.; DALGLEISH, D. G. Production of a novel ingredient from buttermilk. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 9, p. 2744-2750, 2003.

CREUSOT, N. e GRUPPEN, H. Enzyme-induced aggregation and gelation of proteins. **Biotechnology Advances**, v.25, n.6, p.597-601. 2007.

CREUSOT, N. e GRUPPEN, H. Hydrolysis of whey protein isolate with *Bacillus licheniformis* protease: aggregating capacities of peptide fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.21, p.10332-10339. 2008.

COS, P.; CALOMME, M.; SINDAMBIWE, J.B.; BRUYNE, DE T.; CIMANGA, K.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V. Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids. **Planta Medica**, New York, v. 67, p. 515-519, 2001.

DABÉS, A. C.; SANTOS, W. L. M. ; PEREIRA, E. M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n.1, p.136-140, 2001.

DA COSTA, Elizabete Lourenço; DA ROCHA GONTIJO, José Antonio; NETTO, Flavia Maria. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. **International dairy journal**, v. 17, n. 6, p. 632-640, 2007.

- DAMRONGSAKKUL, Siriporn et al. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. **Journal of Industrial and Engineering chemistry**, v. 14, n. 2, p. 202-206, 2008.
- DAMODARAN, S. P., K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre, Atmed. 2010.
- DANIELSEN, Morten; WIND, Anette. Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents. **International journal of food microbiology**, v. 82, n. 1, p. 1-11, 2003.
- DEL MAR CONTRERAS, María et al. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 9-15, 2011.
- DE VUYST, Luc; LEROY, Frederic. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 194-199, 2007.
- DE VRESE, M.; STEGLMAN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHEREZENMEIR, J. Probiotics compensation for lactase insufficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, p. 421-429, 2001.
- DEWETTINCK, Koen et al. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. **International dairy journal**, v. 18, n. 5, p. 436-457, 2008.
- DOUCET, D.; GAUTHIER, S. F.; FOEGEDING, E. A. Rheological characterization of a gel formed during extensive enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 5, p. 711-715, 2001.
- DOUCET, D., OTTER, D. E., GAUTHIER, S. F., *et al.* Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: Peptide Identification and Determination of Enzyme Specificity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 21, p. 6300-6308. 2003.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/175342/1/Indicadores-leite-77-Abril.pdf>> Acesso em: Ago. 2018.
- ELIAS, Ryan J.; KELLERBY, Sarah S.; DECKER, Eric A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 48, n. 5, p. 430-441, 2008.
- ELLNAIN-WOJTASZEK, M.; KRUCZYŃSKI, Z.; KASPRZAK, J. Investigation of the free radical scavenging activity of Ginkgo biloba L. leaves. **Fitoterapia**, v. 74, n. 1-2, p. 1-6, 2003.
- FAUQUANT, Caroline et al. Membrane phospholipids and sterols in microfiltered milk fat globules. **European journal of lipid science and technology**, v. 109, n. 12, p. 1167-1173, 2007.
- FAUQUANT, Jacques et. al. Combination of homogenization and cross-flow microfiltration to remove microorganisms from industrial buttermilks with na efficient permeation of

proteins and lipids. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 21, p. 131-141, 2014.

FOSCHIATTI, Michela et al. Inhibition of cathelicidin activity by bacterial exopolysaccharides. **Molecular microbiology**, v. 72, n. 5, p. 1137-1146, 2009.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Antibacterial Activities of Phenolic Benzaldehydes and Benzoic Acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, New York, v. 66, n. 10, p. 1811-1821, 2003.

FUGLSANG, Anders; NILSSON, Dan; NYBORG, Niels CB. Characterization of new milk-derived inhibitors of angiotensin converting enzyme in vitro and in vivo. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 18, n. 5, p. 407-412, 2003.

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.

GASSI, J., FAMELART, M.; LOPEZ, C. Heat treatment of cream affects the physicochemical properties of sweet buttermilk. **Dairy Science technology**. v.88, p.369-385, 2008.

GAVELLA, Mirjana et al. Antioxidant properties of ganglioside micelles. **Free radical research**, v. 41, n. 10, p. 1143-1150, 2007.

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.

GOEL, M. C. et al. Fate of coliforms in yogurt, buttermilk, sour cream, and cottage cheese during refrigerated storage. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 34, n. 1, p. 54-58, 1971.

GONG, H. S. et al. active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1. 0391 isolated from “Jiaoke”, a traditional fermented cream from China. **Food Control**, v. 21, n. 1, p. 89-96, 2010.

GORDON, Y. Jerold; ROMANOWSKI, Eric G.; MCDERMOTT, Alison M. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. **Current eye research**, v. 30, n. 7, p. 505-515, 2005.

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.

GUTTEBERG, TORE JARL; DALAKER, K. N. U. T.; VORLAND, LARS H. Early response in neonatal septicemia. The effect of *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* and tumor necrosis factor on the generation of lactoferrin. **APMIS**, v. 98, n. 7-12, p. 1027-1032, 1990.

GUEDES NETO, L. G. **Produção de queijo coalho em Pernambuco: isolamento e identificação de *Staphylococcus spp* e bactérias ácido-láticas e de sua atividade antagonista *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 94 f, 2004.

GUGGENMOS, J.; SCHUBART, A. S.; OGG, S.; ANDERSSON, M.; OLSSON, T.; MATHER, I. H.; LININGTON, C. Antibody cross-reactivity between myelin oligodendrocyte glycoprotein and the milk protein butyrophilin in multiple sclerosis. **The Journal of Immunology**, v.172, p. 661–668, 2004.

GUO, M. R. et al. Susceptibility of β -lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by pepsin and trypsin. **Journal of dairy science**, v. 78, n. 11, p. 2336-2344, 1995.

GUO, Yuxing; PAN, Daodong; TANOKURA, Masaru. Otimização das condições de hidrólise para a produção dos peptídeos inibidores da enzima de conversão da angiotensina-I (ECA) a partir da proteína do soro de leite, utilizando a metodologia da superfície de resposta. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 328-333, 2009.

GUYOMARC'H, Fanny et al. Heat-induced aggregation of whey proteins in the presence of κ -casein or sodium caseinate. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 4, p. 1103-1110, 2009.

H. MULDER, P. WALSTRA **O glóbulo da gordura do leite** Ciência em emulsão aplicada a produtos lácteos e alimentos comparáveis, Comunicação técnica, Commonwealth Bureau of Dairy Science and Technology, Reino Unido, 1974.

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.

HAILESELASSIE, S. S.; LEE, B. H.; GIBBS, B. F. Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese. **Journal of dairy science**, v. 82, n. 8, p. 1612-1617, 1999.

HALE, John DF; HANCOCK, Robert EW. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 5, n. 6, p. 951-959, 2007.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. **Oxidative stress and antioxidant protection: some special cases**. In: Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. editors. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3 ed. Oxford: Clarendon Press, p. 530-533, 1999.

HAMOSH, Margrit et al. Protective function of human milk: the milk fat globule. In: **Seminars in perinatology**. WB Saunders, 1999. p. 242-249.

HANCOCK, Robert EW; SAHL, Hans-Georg. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551-1557, 2006.

HANCOCK J T, SALISBURY V, OVEJERO-BOGLIONE M C, CHERRY R, HOARE C, EISENTHAL R AND HARRISON R. **Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 3308–3310, 2002.

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.

HEBATALLAH et al., **Buttermilk: one of the oldest functional foods**. Department of science and technology, faculty of agriculture, university of Alexandria, Egypt. ISSN 0378 2700, 2018.

HEKMAT, Sharareh; MCMAHON, Donald J. Distribution of iron between caseins and whey proteins in acidified milk. **LWT-Food Science and Technology**, v. 31, n. 7-8, p. 632-638, 1998.

HETTIARACHCHY, N. S. et al. Natural antioxidant extract from fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) for ground beef patties. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 3, p. 516-519, 1996.

HILDE, M.; OSTILE, M. H. H.; JUDITH, N. A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. **International Journal of Food Microbiology**, Cambridge, v. 87, p. 17-27, 2003.

HOLZMULLER W.; KULOZIK U. Quantification of MFGM proteins in buttermilk and butter serum by means of a stain free SDS-PAGE method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.49, p. 102–109, 2016.

I. SODINI, P. MORIN, A. OLABI AND R. JIMENEZ-FLORES, Compositional and functional properties of buttermilk: a comparison between sweet, sour and whey buttermilk. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, 16, pp. 391-404, 2011.

ISOLAURI, E., SÜTAS, Y., KANKAAPÄÄ, P., ARVILOMMI, H., SALMINEN, S. Probiotics: effects of immunity. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, p. 444-450, 2001.

JACKSON, M. S., BIRD, A. R., MCORIST, A. I. Comparison of two selective media for the detection and enumeration of lactobacilli in human faeces. **Journal of Microbiology Methods**, Amsterdam, v. 51, p. 313-321, 2002.

JAKHAR, Manju; JAIN, Monika. **Development of buttermilk with fruit juices and appraisal of their nutritional qualities**. 2019.

JANITHA, PK.; WANASUNDARA, PD.; ROSS, ARS.; AMAROWICZ, R.; AMBROSE, SJ.; PEGG, RB.; SHAND, PJ. Peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity from defibrinated, hydrolyzed bovine plasma. **J Agric Food Chem**. v.50, p.6981–6988, 2002.

JANSEN, S.J.K. Oxidative stress and free radicals. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, Amsterdam, v. 666, n. 1/2, p. 387-392, 2003.

JIANG, Jingli et al. Yak milk casein as a functional ingredient: preparation and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 1, p. 18-25, 2007.

JOO, Hwang-Soo; OTTO, Michael. Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1848, n. 11, p. 3055-3061, 2015.

JULIANO, R. S. et al. Desenvolvimento de sobremesa láctea tipo frozen yogurt com características funcionais. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 3464-3471, 2015.

JU, Z. Y.; KILARA, Arun. Gelation of hydrolysates of a whey protein isolate induced by heat, protease, salts and acid. **International dairy journal**, v. 8, n. 4, p. 303-309, 1998.

KAGAN, Bruce L. et al. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 1, p. 210-214, 1990.

KANG, Joo Hyun et al. Structure–biological activity relationships of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin. **International journal of peptide and protein research**, v. 48, n. 4, p. 357-363, 1996.

KATHARIOU, S. *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation. **International Journal of Food Microbiology**, Cambridge, v. 91, p. 167-174, 2004.

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.

KHEDID, K. et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. **Microbiological research**, v. 164, n. 1, p. 81-91, 2009.

KIM, S. B. et al. Enzymatic hydrolysis of heated whey: iron-binding ability of peptides and antigenic protein fractions. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 9, p. 4033-4042, 2007.

KIVANC, Merih; YILMAZ, Meral; ÇAKIR, ERDOĞAN. Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, n. 3, p. 313-324, 2011.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 12, n. 1-3, p. 39-45, 1993.

KLEBER, N., KRAUSE, I., ILLGNER, S., et al. The antigenic response of β -lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation. **European Food Research and Technology**, v.219, n.2, p.105-110. 2004.

KONG, Baohua; XIONG, Youling L. Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 16, p. 6059-6068, 2006.

KULLISAAR, T.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M.; VIHALEM, T.; ANNUK, H.; KAIRANE, C.; KILK, A. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, Cambridge, v. 72, p. 215- 224, 2002.

KUNST, Ton; WHITAKER, J. R. Protein modification to optimize functionality protein hydrolysates. 2003.

LAHL, William J.; BRAUN, Steven D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food technology (Chicago)**, v. 48, n. 10, p. 68-71, 1994.

LASSOUED, Imen et al. Bioactive peptides identified in thornback ray skin's gelatin hydrolysates by proteases from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Journal of proteomics**, v. 128, p. 8-17, 2015.

LAHOV, E.; REGELSON, W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 131-145, 1996.

LEINDECKER, G. C. **Separação das proteínas do soro do leite in natura por ultrafiltração**. Monografia (Formação em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

LEROY, Frédéric; DE VUYST, Luc. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.

LIN, M. Y.; CHANG, F. J. Antioxidative Effect of Intestinal Bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. **Digestive Diseases and Sciences**, Stanford, v. 45, n. 8, p. 1617-1622, 2000.

LIN, M.; YEN, C. Antioxidative Ability of Lactic Acid Bacteria. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington DC, v. 47, n. 4, 1460-1466, 1999.

LINDMARK-MÅNSSON, Helena; ÅKESSON, B. Antioxidative factors in milk. **British journal of Nutrition**, v. 84, n. S1, p. 103-110, 2000.

LÓPEZ-FANDIÑO, R.; OTTE, J.; VAN CAMP, John. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1277-1293, 2006.

LORENZEN, P. Chr; SCHLIMME, E. Experimentelle Untersuchungen zum Vergleich der Enzyminduzierten Proteinaggregation (EIPA) und der Plastein-Reaktion an Natrium-Caseinat-Proteolysaten. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**, v. 43, n. 1, p. 45-51, 1991.

MACHADO, R.M.G.; FREIRE, V.H.; SILVA, P.C.; FIGUERÊDO, D.V.; FERREIRA, P.E. Controle ambiental nas pequenas e médias indústrias de laticínios. Projeto Minas Ambiente, Belo Horizonte, 224p., 2002.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall. 2004.

MADUREIRA, A. R. et al. Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 2, p. 437-455, 2010.

MAKINO, S. I.; KAWAMOTO, K.; TAKESHI, K.; OKADA, Y.; YAMASAKI, M.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan during 2001. **International Journal of Food Microbiology**, Cambridge, v. 104, n. 2, p. 189-196, 2005.

MAKRAS, Lefteris; DE VUYST, Luc. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. **International dairy journal**, v. 16, n. 9, p. 1049-1057, 2006.

MAKRAS, Lefteris et al. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 3, p. 241-247, 2006.

MARSHALL, A.; DAUFIN, G. Physico-chemical aspects of membrane fouling by dairy fluids. IDF Special, In: Fouling and cleaning in pressure driven membrane processes, **International Dairy Federation**. Belgium, 1995.

METCHNIKOFF, E. **The prolongation of life**. New York: Putnam's son, p. 1845-1916, 1908.

MARTINS, A. D. O.; MENDONÇA, R. C. S.; SILVA, D. L.; RAMOS, M. S.; MARTINS, M. C.; DONZELE, J. L. N; ANDRADE, E. J. Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagônica frente a microrganismos indicadores. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 5, n.1, p. 53-59, 2006.

MATHER, Ian H. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. **Journal of dairy science**, v. 83, n. 2, p. 203-247, 2000.

MARUYAMA, Susumu et al. Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 1581-1586, 1987.

MEISEL, Hans. Overview on milk protein-derived peptides. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5-6, p. 363-373, 1998.

MEISEL, H. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. **Livest Prod Sci.** v. 50, p. 125-138, 1997.

MIGUEL, M. et al. ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 211-214, 2009.

MINE, Yoshinori; LI-CHAN, Eunice; JIANG, Bo (Ed.). **Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals**. John Wiley & Sons, 2011.

MÖLLER, N.; SCHOLZ-AHRENS, K.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. **Europe Journal Nutrition**, 47, 171-182, 2008.

MOHANTY, Debapriya et al. Milk derived antimicrobial bioactive peptides: a review. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 4, p. 837-846, 2016.

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

MORIN, P.; JIMÉNEZ-FLORES, R.; POULIOT, Y. Effect of temperature and pore size on the fractionation of fresh and reconstituted buttermilk by microfiltration. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 2, p. 267-273, 2004.

MORIN, Pierre et al. Microfiltration of buttermilk and washed cream buttermilk for concentration of milk fat globule membrane components. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 5, p. 2132-2140, 2007.

MORIN, Pierre et al. Microfiltration of buttermilk and washed cream buttermilk for concentration of milk fat globule membrane components. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 5, p. 2132-2140, 2007.

MUDGAL, Prashant et al. Effect of disulfide interactions and hydrolysis on the thermal aggregation of β -lactoglobulin. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 5, p. 1491-1497, 2010.

MULLALLY, Margaret M.; MEISEL, Hans; FITZGERALD, Richard J. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 5, p. 299-303, 1997.

NAQASH, Shabeena Yousuf; NAZEER, R. A. Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from pink perch (*Nemipterus japonicus*) muscle. **Journal of food science and technology**, v. 50, n. 5, p. 972-978, 2013.

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 butter dairy protein hydrolysates. **Journal of Food Engineering**, v. 128, p. 127-131, 2014.

NOCTOR et al., **Activity of Buttermilk Against SW480 Colon Cancer Cells is Associated with Caspase-Independent Cell Death and Attenuation of Wnt, Akt, and ERK Signaling**. School of Biotechnology, Dublin City University Ireland. Nutrition and cancer v68, 2016.

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 proteases. Novozymes Switzerland. **Nutritional and technological aspects of the membrane material of the milk fat globule** v. 18, p. 450-459, 2018.

O'LOUGHLIN, Ian B. et al. Whey protein isolate polydispersity affects enzymatic hydrolysis outcomes. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2334-2342, 2013.

O'SULLIVAN, L., ROSS, R.P., HILL, C.,. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, 84, 593-604, 2002

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.

ORTIZ-CHAO, Paola et al. Production of novel ACE inhibitory peptides from β -lactoglobulin using Protease N Amano. **International dairy journal**, v. 19, n. 2, p. 69-76, 2009.

OTTE, J., LOMHOLT, S. B., IPSEN, R., et al. Aggregate Formation during hydrolysis of β -Lactoglobulin with a Glu and Asp specific protease from *Bacillus licheniformis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.12, p.4889-4896. 1997.

OTTO, B. R.; VERWEIJ-VAN VUGHT, A. M. J. J.; MACLAREN, D. M. Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. **Critical reviews in microbiology**, v. 18, n. 3, p. 217-233, 1992.

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

PELLEGRINI, Antonio et al. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α -lactalbumin molecule. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1426, n. 3, p. 439-448, 1999.

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.

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

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.

PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 229-240, 2007.

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.

PESSIONE, E.; CIRINCIONE, S. Bioactive Molecules Released in Food by Lactic Acid Bacteria: Encrypted Peptides and Biogenic Amines. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 876, 2016. ISSN 1664-302X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4899451/>>.

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.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, Anne; ROKKA, Timo; KORHONEN, Hannu. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 4, p. 325-331, 1998

PINTADO, C. M.; OLIVEIRA, A.; PAMPULHA, M.; FERREIRA, M. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. **Food Microbiology**, Washington, DC, v. 22, p. 79-85, 2005.

POULIOT, Y., GUY, M. M., TREMBLAY, M., *et al.* Isolation and characterization of an aggregating peptide from a tryptic hydrolysate of whey proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.9, p.3760-3764. 2009.

POWER, Olive; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R. J. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. **Amino acids**, v. 44, n. 3, p. 797-820, 2013.

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.

RAHMAN, Khalid. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical interventions in aging**, v. 2, n. 2, p. 219, 2007.

RAIKOS, Vassilios et al. The use of sedimentation field-flow fractionation in the size characterization of bovine milk fat globules as affected by heat treatment. **Food research international**, v. 42, n. 5-6, p. 659-665, 2009.

RAO, H. G. R. Mechanisms of flux decline during ultrafiltration of dairy products and influence of pH on flux rates of whey and buttermilk. **Desalination**, v. 144 p. 319-324, 2002.

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.

REKDAL, Øystein et al. Construction and synthesis of lactoferricin derivatives with enhanced antibacterial activity. **Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society**, v. 5, n. 1, p. 32-45, 1999.

REKHIF, N.; ATRIH, A.; LEFEBVREXY, G. Activity of plantaricin SA6, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* SA6 isolated from fermented sausage. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, n. 4, p. 349-358, 1995.

RICE, G.S. ; KENTISHA, S.E.; O'CONNORA, A.J.; BARBERB, A.R.; PIHLAJAMAKIC, A.; NYSTROMC, M. ; STEVENS, G.W. Analysis of separation and fouling behaviour during nanofiltration of dairy ultrafiltration permeates. **Desalination**, v. 236, p. 23–29, 2009.

RIES, D. et al. Antioxidant properties of caseins and whey proteins in model oil-in-water emulsions. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 2, p. 72-78, 2010.

RIPOLLÉS, Daniel et al. Antioxidant activity of co-products from milk fat processing and their enzymatic hydrolysates obtained with different proteolytic preparations. **International dairy journal**, v. 60, p. 70-77, 2016.

RIVAL, Sandrine G.; BOERIU, Carmen G.; WICHERS, Harry J. Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 49, n. 1, p. 295-302, 2001.

ROBERT, MC.; RAZANAME, A.; MUTTER, M.; JUILLERAT MA. Identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. **J Agric Food Chem**. v. 52, p. 6923–6931, 2004.

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.

RODRIGUES, H. G.; DINIZ, Y. S.; FAINE, L. A.; ALMEIDA, J. A.; FERNANDES, A. A. H.; NOVELLI, E. L. L. B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rotina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 315-320, 2003.

RODRIGUEZ, Eva et al. Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in raw-milk cheese. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 7, p. 3399-3404, 2005.

RODRIGUEZ, Eva et al. Antimicrobial activity of Pediocin-producing *Lactococcus lactics* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 15, p. 131-137, 2005.

SABADIN, I., VILLAS-BOAS, M., ZOLLNER, R. L., *et al.* Effect of combined treatment of hydrolysis and polymerization with transglutaminase on β -lactoglobulin antigenicity. **European Food Research and Technology**, v.235, n.5, p.801-809. 2012.

SACHDEVA S.; BUCHHEIM, W. **Recuperação de fosfolipídios de soro de leite usando processamento de membrana** Kiel Milchwirtsch. Forsch. v. 49, p. 47 – 68, 1997.

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.

SAVADOGO, Aly et al. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. **Pakistan Journal of nutrition**, v. 3, n. 3, p. 174-179, 2004.

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-hidroxialcanoatos (PHAs)**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

SHIOTA, M.; TATSUMI, K. Effect of sucrose ester of fatty acid on the antioxidant activity of milk products on fish oil oxidation. **Journal of food science**, v. 67, n. 2, p. 547-552, 2002.

SIMOVA, E. D.; BESHKOVA, D. B.; DIMITROV, Zh P. Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 2, p. 692-701, 2009.

SINGH, Harjinder. The milk fat globule membrane—A biophysical system for food applications. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 11, n. 2-3, p. 154-163, 2006.

SINGH, Harjinder; YE, Aiqian; HORNE, David. Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. **Progress in lipid research**, v. 48, n. 2, p. 92-100, 2009.

SPELLMAN, David et al. Aggregation properties of whey protein hydrolysates generated with *Bacillus licheniformis* proteinase activities. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1258-1265, 2005.

SPELLMAN, D.; O'CUINN, G.; FITZGERALD, R. J. Bitterness in *Bacillus* proteinase hydrolysates of whey proteins. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 440-446, 2009.

SPITSBERG, Vitaly L.; IVANOV, Liza; SHRITZ, Vladimir. Recovery of milk fat globule membrane (MFGM) from buttermilk: effect of Ca-binding salts. **Journal of Dairy Research**, v. 86, n. 3, p. 374-376, 2019.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SODINI, I.; MORIN, P.; OLABI, A.; JIMÉNEZ-FLORES, R. Compositional and Functional Properties of Buttermilk: A Comparison Between Sweet, Sour, and Whey Buttermilk. **Journal of Dairy Science** v.89, p.525 – 536, 2006.

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

SPITSBERG V; GOREWIT R. In vitro phosphorylated bovine Milk fat globule membrane proteins. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 8, p. 181–189, 1997.

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.

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.

SUN, Qian; SHEN, Huixing; LUO, Yongkang. Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. **Journal of food science and technology**, v. 48, n. 1, p. 53-60, 2011.

SVANBORG, Sigrid et al. Efeitos iniciais da pasteurização no fracionamento de proteínas do leite desnatado por microfiltração. **International Dairy Journal** , v. 37, n. 1, p. 26-30, 2014.

TARDIOLI, P. W. **Hidrólise controlada de proteínas do soro de queijo usando Carboxipeptidase A e alcalase imobilizadas multipontualmente em agarose**. (Tese). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

TARDIOLI, P. W., PEDROCHE, J., GIORDANO, R. L. C., *et al.* Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized Alcalase-glyoxyl agarose. **Biotechnology Progress**, v.19, n.2, p.352-360. 2003.

TAUZIN, Jérôme; MICLO, Laurent; GAILLARD, Jean-Luc. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α S2-casein. **FEBS letters**, v. 531, n. 2, p. 369-374, 2002.

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.

TAYLOR, M. J.; RICHARDSON, T. Antioxidant activity of skim milk: effect of heat and resultant sulfhydryl groups. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 11, p. 1783-1795, 1980.

THÉOLIER, Jérémie et al. Antimicrobial peptides of dairy proteins: From fundamental to applications. **Food reviews international**, v. 30, n. 2, p. 134-154, 2014.

TSOU, May-June et al. Limited enzymatic hydrolysis of soy protein enhances cholesterol absorption inhibition in Caco-2 cells. **臺灣農業化學與食品科學**, v. 47, n. 1, p. 1-8, 2009.

VANDERGHEN, Caroline et al. Study on the susceptibility of the bovine milk fat globule membrane proteins to enzymatic hydrolysis and organization of some of the proteins. **International dairy journal**, v. 21, n. 5, p. 312-318, 2011.

VÁSQUEZ-VIVAR, J.; WHITSETT, J.; MARTÁSEK, P.; HOGG, N.; KALYANARARAMAN, B. Reaction of tetrahydrobiopterin with superoxide: EPR132 Kinetic analyses and Characterization of the Pteridine radical. **Free Radical Biology & Medicine**, Maryland Heights, v. 31, n. 8, p. 975-985, 2001.

VAUGHAN, O. W.; KNAUFF, R. E. Chemical state and nutritional availability of iron in a prepared infant formula. **Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 9, p. 1650-1654, 1961.

VERCELLOTTI, J. R.; ST. ANGELO, Allen J.; SPANIER, Arthur M. Lipid oxidation in foods: An overview.

VERDI, K. **Produção de peptídeos de soro de leite em Reator Enzimático de Membrana: perfil molecular, atividade biológica e atributos de sabor**. Qualificação (mestrado em ciência e tecnologia de alimentos), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2017.

VOJDANI, A.; CAMPBELL, A.; ANYANWU, E.; KASHANIAN, A.; BOCK, K. Antibodies to neuron-specific antigens in children with autism: possible cross-reaction with encephalitogenic proteins from milk, Chlamydia pneumoniae and Streptococcus group A. **Journal of Neuroimmunology**, v.129, p. 168–177, 2002.

XU, J-Y.; QIN, L-Q.; WANG, P-Y.; LI, W.; CHANG C. Effect of Milk tripeptides on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutrition**, v.24, p. 933–940, 2008.

WONG, P. Y. Y.; KITTS, D. D. Chemistry of buttermilk solid antioxidant activity. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 5, p. 1541-1547, 2003.

WILLIAMS, P.C. **Commercial Near-Infrared Reflectance Analyzers**. In: WILLIAMS, P.C.; NORRIS, K.H. (Ed) Near-infrared technology in the agricultural and food industries. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, p.1074-142, 1987.

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.

YANG, De et al. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 181-215, 2004.

YE, Aiqian et al. Characterization of protein components of natural and heat-treated milk fat globule membranes. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 4, p. 393-402, 2002.

YE, A.; CUI, J; SINGH, H. Proteólise de proteínas de membrana de glóbulo de gordura de leite durante digestão gástrica in vitro de leite. **Journal of dairy science** , v. 94, n. 6, p. 2762-2770, 2011.

YOUNG, Denise; TSAO, Rong; MINE, Yoshinori. Nutraceuticals and antioxidant function. **Functional foods, nutraceuticals, and degenerative disease prevention**, p. 75-112, 2011.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, Washington DC, v. 74, p. 139-161, 1994.

YUST, M. D. M., PEDROCHE, J., MILLÁN-LINARES, M. D. C., *et al.* Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. **Food Chemistry**, v.122, n.4, p.1212-1217. 2010.

ZANONI, S.; POMPEI, A.; CORDISCO, L.; AMARETTI, A.; ROSSI, M.; MATTEUZZI, D. Growth kinetics on oligo and polysaccharides and promising features of three antioxidative potential probiotic strains. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v. 105, p. 1266-1276, 2008.

ZHANG, Zhong et al. Purification of lactulose syrup by using nanofiltration in a diafiltration mode. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 1, p. 112-118, 2011.

ZHANG, Qiu-Xiang et al. 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, n. 3, p. 367-373, 2013.

ZHOU, Xin et al. Bio-utilization of cheese manufacturing wastes (cheese whey powder) for bioethanol and specific product (galactonic acid) production via a two-step bioprocess. **Bioresource technology**, v. 272, p. 70-76, 2019.

ZHU, Kexue; ZHOU, Huiming; QIAN, Haifeng. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1296-1302, 2006.

ZUBILLAGA, MP; MAERKER, G .; FOGLIA, TA Atividade antioxidante do nitrito de sódio na carne. **Jornal da Sociedade Americana de Químicos de Petróleo** , v. 61, n. 4, p. 772-776, 1984.

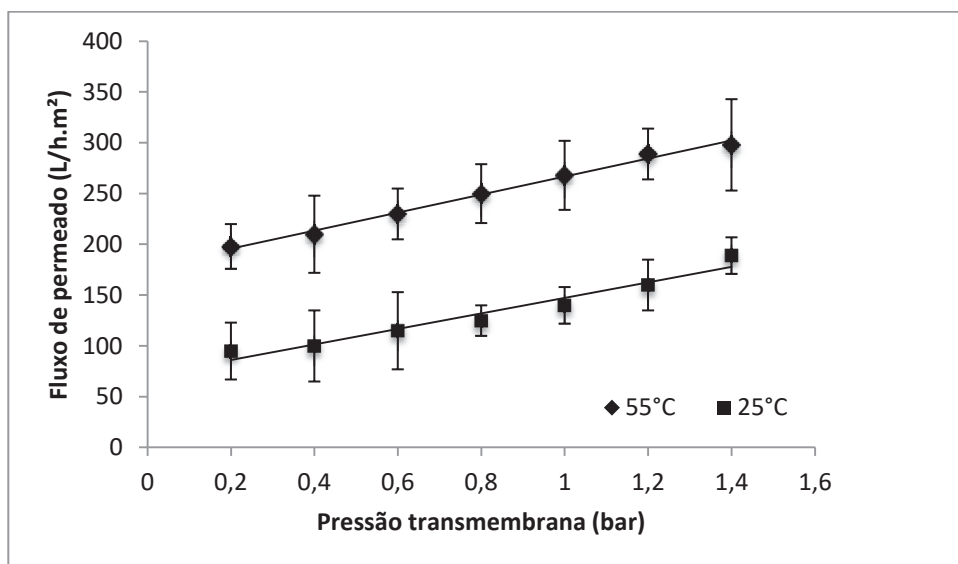
APÊNDICE A: PROCEDIMENTO DE LIMPEZA DA MEMBRANA

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. 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: FLUXO DE PERMEADO PARA A ÁGUA E PARA A SOLUÇÃO PROTEICA

1) Membrana de UF (30-80 kDa); temperaturas de 25°C e 55°C.



**APÊNDICE C: CÁLCULO DA CADEIA MÉDIA DOS PEPTÍDEOS COM
HIDRÓLISE DE DIFERENTES ENZIMAS**

1) Alcalase

| Tempo (h) | Média (GH) | Comprimento médio das cadeias (Nº de resíduos) | Massa molecular média (kDa) |
|-----------|------------|--|-----------------------------|
| 0,2 | 2,1 | - | - |
| 0,3 | 4,4 | 22,727 | 2727,273 |
| 0,5 | 5,9 | 16,949 | 2033,898 |
| 0,7 | 13,8 | 7,246 | 869,565 |
| 0,8 | 16,9 | 5,917 | 710,059 |
| 1,0 | 18 | 5,556 | 666,667 |
| 1,2 | 19,12 | 5,230 | 627,615 |
| 1,3 | 20,6 | 4,854 | 582,524 |
| 1,5 | 21,9 | 4,566 | 547,945 |
| 1,7 | 22,58 | 4,429 | 531,444 |
| 1,8 | 23,1 | 4,329 | 519,481 |
| 2,0 | 23,15 | 4,320 | 518,359 |
| 2,2 | 24,6 | 4,065 | 487,805 |
| 2,3 | 25,1 | 3,984 | 478,088 |
| 2,5 | 25,8 | 3,968 | 476,190 |

2) Prolyve

| Tempo (h) | Média (GH) | Comprimento médio das cadeias (Nº de resíduos) | Massa molecular média (kDa) |
|-----------|------------|--|-----------------------------|
| 0,2 | 1,2 | - | - |
| 0,3 | 1,98 | 50,505 | 6060,606 |
| 0,5 | 2,5 | 40,000 | 4800,000 |
| 0,7 | 2,98 | 33,557 | 4026,846 |
| 0,8 | 3,15 | 31,746 | 3809,524 |
| 1,0 | 4,6 | 21,739 | 2608,696 |
| 1,2 | 5,9 | 16,949 | 2033,898 |
| 1,3 | 12,5 | 8,000 | 960,000 |
| 1,5 | 13,5 | 7,407 | 888,889 |
| 1,7 | 16,8 | 5,952 | 714,286 |
| 1,8 | 18,2 | 5,495 | 659,341 |
| 2,0 | 18,9 | 5,291 | 634,921 |
| 2,2 | 19,45 | 5,141 | 616,967 |
| 2,3 | 20,45 | 4,890 | 586,797 |
| 2,5 | 23,45 | 4,264 | 511,727 |
| 2,7 | 23,98 | 4,170 | 500,417 |
| 2,8 | 24,89 | 4,018 | 482,121 |

| | | | |
|-----|-------|-------|---------|
| 3,0 | 25,2 | 3,968 | 476,190 |
| 3,2 | 25,4 | 3,937 | 472,441 |
| 3,3 | 25,36 | 3,943 | 473,186 |
| 3,5 | 25,2 | 3,968 | 476,190 |

3) Neutrase

| Tempo (h) | Média (GH) | Comprimento médio das cadeias (Nº de resíduos) | Massa molecular média (kDa) |
|-----------|------------|--|-----------------------------|
| 0,2 | 1,96 | - | - |
| 0,3 | 1,98 | 50,505 | 6060,606 |
| 0,5 | 2,51 | 39,841 | 4780,876 |
| 0,7 | 3,91 | 25,575 | 3069,054 |
| 0,8 | 4,2 | 23,810 | 2857,143 |
| 1,0 | 4,84 | 20,661 | 2479,339 |
| 1,2 | 5,23 | 19,120 | 2294,455 |
| 1,3 | 5,4 | 18,519 | 2222,222 |
| 1,5 | 5,6 | 17,857 | 2142,857 |
| 1,7 | 5,79 | 17,271 | 2072,539 |
| 1,8 | 5,8 | 17,241 | 2068,966 |

4) Lypaine

| Tempo (h) | Média (GH) | Comprimento médio das cadeias (Nº de resíduos) | Massa molecular média (kDa) |
|-----------|------------|--|-----------------------------|
| 0,2 | 0 | - | - |
| 1,0 | 0 | - | - |
| 2,0 | 0 | - | - |
| 3,0 | 0 | - | - |
| 4,0 | 0 | - | - |
| 5,0 | 0 | - | - |
| 5,3 | 0 | - | - |

**APÊNDICE D: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EXPRESSA EM $\mu\text{mol TE/g}$ E EM
% de inibição PARA AS AMOSTRAS LIOFILIZADAS**

| Amostras | $\mu\text{mol TE/g}$ | % de inibição |
|--------------------------------|--|----------------------|
| <i>Buttermilk</i> | 396,81 \pm 3,95 | 38,97 \pm 0,46 |
| Alcalase | 803,58 \pm 1,57 | 77,77 \pm 0,17 |
| Neutrase | 118,82 \pm 4,16 | 12,50 \pm 0,66 |
| Prolyve | 795,73 \pm 5,66 | 77,02 \pm 0,17 |
| Lypaine | 367,49 \pm 5,35 | 36,20 \pm 0,48 |
| Alcalase + Neutrase | 834,21 \pm 2,40 | 80,69 \pm 0,15 |
| Alcalase + Neutrase (permeado) | 956,87 \pm 1,57 | 89,56 \pm 0,38 |
| Alcalase + Neutrase (retido) | 825,48 \pm 3,12 | 79,58 \pm 0,49 |

APÊNDICE E: ARTIGO CIENTÍFICO

Biorreator a membrana para a hidrólise e separação de peptídeos a partir de *buttermilk*

Sandrini Slongo Fortuna^a, Vandré Barbosa Brião^a

^a Universidade de Passo Fundo (UPF), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Passo Fundo- RS, Brasil.

Destaques

- A hidrólise combinada atingiu maior GH.
- A filtração com membrana de UF chegou a R = 60,25 %.
- A amostra permeada e liofilizada apresentou maior atividade antioxidante.

Resumo

Da produção da manteiga libera-se o *buttermilk*, o qual contém importantes nutrientes como proteínas, lactose e minerais. As proteínas, quando reduzidas a peptídeos, apresentam atividade biológica como antioxidante e antimicrobiana. Este estudo visou obter peptídeos de baixo peso molecular a partir do *buttermilk* através de um processo combinado de hidrólise enzimática e separação por membranas. O *buttermilk* submetido à hidrólise com diferentes enzimas apresentou diferentes graus de hidrólise (GH). As enzimas Alcalase e Neutrase utilizadas em sequência apresentaram melhor ação chegando a um GH de 34 %. A separação do *buttermilk* hidrolisado pela membrana de UF, permitiu uma rejeição da membrana de 60,25 %, comprovando que a hidrólise possibilitou maior passagem de proteína para o permeado. As amostras hidrolisadas apresentaram bioatividade, com destaque para o *buttermilk* hidrolisado com Alcalase e Neutrase, que apresentou maior atividade antioxidante. Foi possível aliar a obtenção de um hidrolisado proteico, comprovando sua bioatividade, com o reaproveitamento de um subproduto pouco valorizado na indústria de alimentos.

Palavras-chave: *buttermilk*, peptídeos, proteína, bioatividade.

1 Introdução

Buttermilk é um líquido liberado durante a produção de manteiga. O'connell e Fox (2018) destacam que a produção mundial de *buttermilk* é de $6,5 \times 10^6$ toneladas anuais, sendo um importante candidato à conquista de nicho de mercado. É um subproduto complexo, e contém proteínas, lipídeos, oligossacarídeos, fosfolipídios, glicolipídeos, glicoproteínas e muitos componentes com atividades biológicas em que particularmente as proteínas. Essas, quando reduzidas à peptídeos, apresentam grande atividade biológica (ASTAIRE et al., 2003).

As proteínas presentes no *buttermilk* são fonte de peptídeos biologicamente ativos e apresentam peptídeos criptografados na sua estrutura, sendo liberados pelo processo de

digestão. Após serem absorvidos e transportados para os órgãos, os peptídeos atuam em diversas vias metabólicas específicas e fornecendo diversos benefícios à saúde. Porém, enquanto os peptídeos estiverem presos na sequência original da proteína, eles possuem menor atividade biológica. Além disso, proteínas com estrutura globular compacta podem causar alergia, pois as enzimas do sistema digestivo não chegam até os sítios de clivagem não ocorrendo a digestão. A hidrólise enzimática libera os peptídeos e diminui a alergenicidade por expor as cadeias, facilitando a sua digestão.

O grau de hidrólise e a massa molecular dos peptídeos obtidos no processo de hidrólise estão diretamente relacionados 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. No entanto, além da clivagem, é necessário também fazer a separação dos peptídeos produzidos.

Os biorreatores à membrana (BRM) permitem operar processos que compreendem etapas de transformação e separação. Eles são constituídos de um tanque onde há transformação química dos reagentes, no qual uma membrana com tamanho de poro adequado faz a separação do produto. Há diversos trabalhos envolvendo o uso de BRM para a produção de peptídeos, usando como carga proteica soro de leite (VERDI, 2017), leite (ARAUS, 2011), resíduos cárneos (ZUBILLAGA, 1984) e outros. Uma das maiores vantagens é que esta configuração permite o controle do peso molecular dos produtos selecionando adequadamente o poro da membrana (CHEISON et al., 2006; PRIETO et al., 2007). No entanto, o *buttermilk* possui em sua composição gordura (fosfolipídeos e outros), que também é retida, podendo causar incrustação da membrana, dificultando a seletividade e o desenvolvimento de subprodutos com aplicação industrial. A utilização do *buttermilk* em ações combinadas de hidrólise enzimática e separação por membranas, utilizando um biorreator, permite utilizar esse resíduo como matéria prima para produção de peptídeos com atividade biológica.

Muitos trabalhos têm sido focados no aproveitamento da fração lipídica do *buttermilk*. Calvo et. al. (2020) estudaram a caracterização abrangente de lipídeos neutros e polares de *buttermilk* de diferentes fontes e seus isolados da membrana do glóbulo de gordura do leite (MFGM). Jahkar et. al. (2019) estudaram o desenvolvimento de sucos de frutas a partir do *buttermilk* e a avaliação de suas qualidades nutricionais. Spitsberg et. al. (2019) estudaram a recuperação da MFGM do *buttermilk* avaliando o efeito de sais e de ligação de cálcio. Barry et. al., (2017), estudaram a obtenção de fosfolipídeos do *buttermilk* através da hidrólise enzimática e filtração por membranas. Em contrapartida, poucos trabalhos científicos abordam o uso de sua carga proteica para a produção de peptídeos.

Este estudo visou obter peptídeos de baixo peso molecular a partir do *buttermilk* em um biorreator a membranas, utilizando a combinação de uma endoprotease com uma exoprotease para a hidrólise e avaliando a bioatividade dos peptídeos.

2 Experimental

2.1 Buttermilk

O *buttermilk* foi fornecido pela empresa Randon S.A (Vacaria – RS, Brasil). A análise composicional do *buttermilk* foi determinada no Laboratório de Serviço de Análise de Rebanhos Leiteiros (SARLE) da UPF, através do equipamento de Espectroscopia no infravermelho próximo (FTIR) de marca Delta Instruments, que segue a metodologia International Dairy Federation (IDF) 141C. A composição média do *buttermilk* foi de $2,07 \pm 0,02\%$ de proteína, $2,35 \pm 0,03\%$ de gordura, $1,75 \pm 0,02\%$ de lactose e pH de $6,35 \pm 0,10$.

2.2 Hidrólise enzimática

A hidrólise foi realizada em batelada, e produto hidrolisado alimentado no separador por membranas na sequência. Oito litros de buttermilk foram hidrolisados em um bequer nas diferentes condições de temperatura e pH de cada enzima, com agitação constante tendo o pH ajustado conforme necessidade com NaOH 0,1 molar ou ácido láctico 0,5 molar. Após, o buttermilk hidrolisado foi alimentado ao equipamento de separação por membranas.

A avaliação do grau de hidrólise (GH) se deu pelo método do pH-stat, seguindo as seguintes equações, sugeridas por Adler-Nissen (1986):

$$GH (\%) = \frac{B \times N}{Mp \times a \times h} \times 100$$

Onde B é o volume de base consumida durante a hidrólise para manter o pH constante (mL); N é a Normalidade da base; Mp é a Massa de proteína por Kjeldahl (g); a é o Grau de dissociação; H é o Número total de ligações peptídicas antes da reação;

Para o Grau de dissociação:

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pK - pH}}$$

Onde α é o Grau de dissociação; pK varia de acordo com a temperatura da reação; pH é constante;

Para o pK :

$$pK = 7,8 + \left(\frac{298 - T}{298 \times T} \right) \times 2400$$

Onde T é a Temperatura em Kelvin.

As enzimas utilizadas foram a endoprotease Alcalase® (EC3.4.21.62) e metaloprotease Neutrase® (EC3.4.22), da Novozymes (Bagsværd, Dinamarca), e cedidas gentilmente pela empresa LNF Latino Americana. As endoproteases testadas foram Lypaine e Prolyve® (EC 3.4.21.62), adquiridas de Soufflet Biotechnologies SAS (Colombelles, France), e cedidas gentilmente pela empresa WGM Sistemas. Todas as enzimas seguiram as condições do fabricante, conforme o quadro 1:

| Enzimas | Ação | pH | Temperatura (°C) | % enzima | Inativação |
|----------|----------------|-----|------------------|----------|--------------|
| Alcalase | Endoprotease | 8,0 | 55 | 0,5 | 90°C / 20min |
| Neutrase | Metaloprotease | 7,0 | 55 | 1,25 | 90°C / 20min |
| Prolyve | Endoprotease | 8,0 | 55 | 0,5 | 90°C / 5min |
| Lypaine | Endoprotease | 8,0 | 65 | 0,2 | 90°C / 5min |

2.3 Quadro 1: Condições utilizadas para cada enzima.

2.4 Operação do biorreator

A separação dos peptídeos por UF foi realizada por uma membrana de configuração tubular, com área efetiva de 0,1 m² e massa molar de corte na faixa de 30 a 80 kDa, em equipamento piloto fornecido pela WGM Sistemas (São Paulo, Brasil).

A membrana foi submetida à limpeza química com solução de NaOH (pH 11) antes de cada experimento e medido o fluxo com água. O buttermilk hidrolisado foi alimentado ao tanque de aço inoxidável (capacidade de 20 L), bombeado por uma bomba pneumática até o módulo de membrana. Uma válvula de diafragma na linha do retido permite o ajuste da pressão, a qual é verificada em um manômetro. O biorreator está representado pela figura 1.

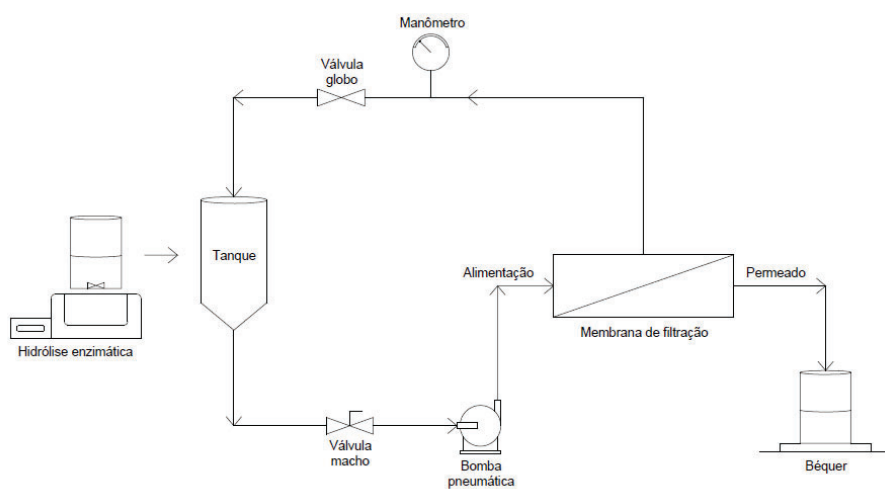


Figura 1: Operação do biorreator.

2.5 Caracterização dos peptídeos

Os peptídeos foram caracterizados pela estimativa do comprimento médio da cadeia, massa molecular média, e por eletroforese em gel.

O comprimento médio da cadeia (CMC) é obtido pela estimativa que um resíduo de aminoácido possua massa molecular média de 120 kDa, conforme descrito por Perea et al. (1993), utilizando as equações 1 e 2.

$$CMC = \frac{100}{GH} \text{ Eq. 1}$$

$$MMM = CMC * 120 \text{ Eq. 2}$$

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. A descrição detalhada do procedimento encontra-se como material suplementar.

2.6 Atividade antioxidante

Usou-se o teste de descoloração de solução de ABTS, de acordo com o método proposto por Re et al. (1999). Uma solução de ABTS 7 mM (100 mL) foi misturada com solução de persulfato de potássio 2,45 mM (100 mL) para gerar o radical $ABTS\bullet+$, e mantida no escuro por 16 horas antes do uso. Antes de cada ensaio, a solução foi diluída em álcool etílico até atingir absorvância de $0,7 \pm 0,05$ a 734 nm.

2.7 Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos foram expostos à análise estatística através da Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey, a 5% de significância.

3 Resultados

As enzimas Alcalase, Prollyve, Neutraxe e Lypaine atingiram respectivamente, os seguintes GH, 25,8%, 25,2%, 5,89% e 0% (figura 1).

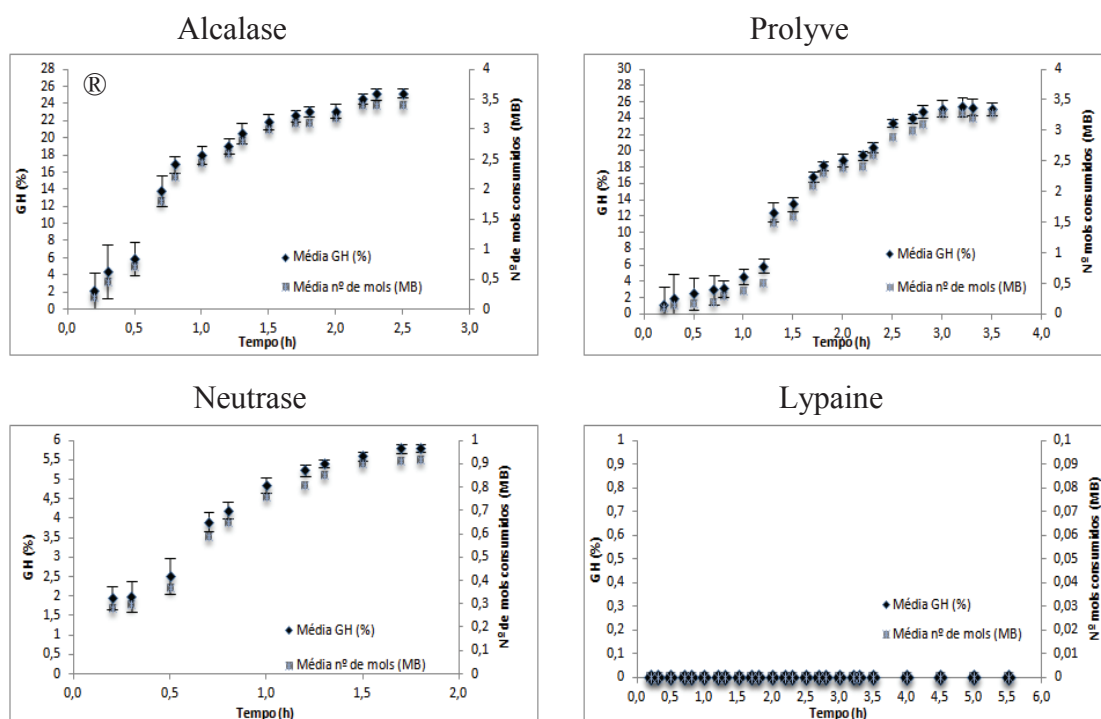


Figura 2: Grau de Hidrólise (GH) e mols consumidos de NaOH das enzimas selecionadas.

Alcalase e Prollyve apresentam comportamento semelhante, ambas são endoproteases, porém a Alcalase é uma serino-protease, com diferencial na sua sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional, apresentando Asp, His e Ser no sítio ativo, os substratos ligam-se à serino-protease através da inserção do aminoácido adjacente ao sítio de clivagem em uma cavidade no sítio ativo da enzima (BEYNON E BOND, 1989; WHITAKER, 1994).

A exopeptidase, neutraxe é mais ativa em pH neutro e possui regiões de α -hélice (38%) e de β -folha pregueada (17%). A enzima Lypaine é também uma endopeptidase e foi

descartada do processo por após 5,3 h não demonstrar alterações no pH, ou seja, não houve atividade enzimática.

Visando aumentar o GH, utilizaram-se as enzimas Alcalase e Neutrase em sequência, como mostra a figura 3. Aliando as duas enzimas com mecanismos de ação diferentes, conseguimos obter um GH significativo, atingindo o seu máximo em 34,02%.

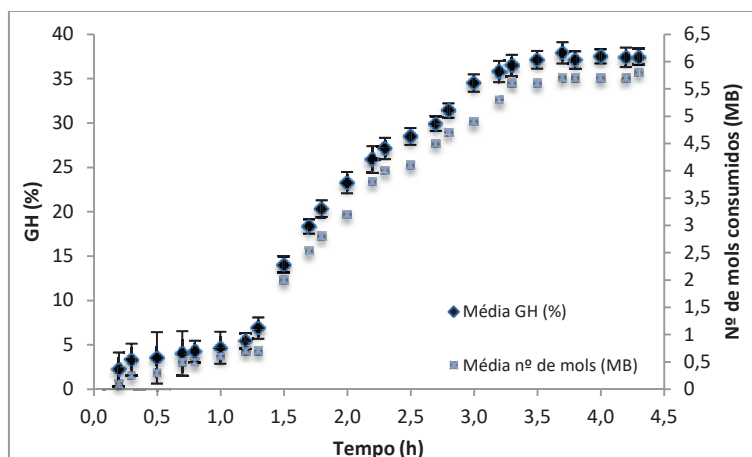


Figura 3: Grau de Hidrólise (GH) e mols consumidos de NaOH das enzimas selecionadas.

A atividade antioxidante foi proporcional ao GH, onde quanto maior o GH, maior a AA, como demonstrado no quadro 2.

| Enzima | Tempo (h) | Média (GH) | AA ($\mu\text{mol TE/g}$ de proteína) |
|---------------------|-----------|------------|--|
| <i>Buttermilk</i> | - | - | 396,81 \pm 3,95 |
| Alcalase | 2,5 | 25,8 | 803,58 \pm 1,57 |
| Prolyve | 3,5 | 25,2 | 795,73 \pm 5,66 |
| Neutrase | 1,8 | 5,8 | 118,82 \pm 4,16 |
| Lypaine | 5,3 | 0 | 367,49 \pm 5,35 |
| Alcalase + Neutrase | 4,3 | 34,02 | 834,21 \pm 2,40 |
| Permeado | - | - | 956,87 \pm 1,57 |
| Retido | - | - | 825,48 \pm 3,12 |

Quadro 2: AA antioxidante das diferentes amostras.

Todas as amostras hidrolisadas mostraram aumento na atividade antioxidante quando comparadas com o *buttermilk* não hidrolisado, exceto a enzima Lypaine, a qual não apresentou nenhuma atividade enzimática e teve resultados quase idênticos ao *buttermilk* não hidrolisado.

A hidrólise aumentou a atividade antioxidante e a eliminação do radical livre em todos os casos. Os maiores valores obtidos foram para o *buttermilk* hidrolisado com Alcalase e Neutrase, a mesma amostra passando pelo processo de filtração (permeado e retido), ficando entre 800 a 1000 $\mu\text{mol TE/g}$ de proteína. Youg et. al., (2011) encontrou valores próximos para o *buttermilk* após hidrólise da Alcalase por 5 horas, 554,4 a 1319,6 $\mu\text{mol TE/g}$ de proteína. Os autores explicam que o desdobramento da estrutura proteica dos aminoácidos expostos, anteriormente indisponível na estrutura da proteína nativa, resulta em um aumento geral da atividade antioxidante.

Foram comparados os fluxos de permeado do *buttermilk* com e sem o processo de hidrólise enzimática, para avaliação do processo.

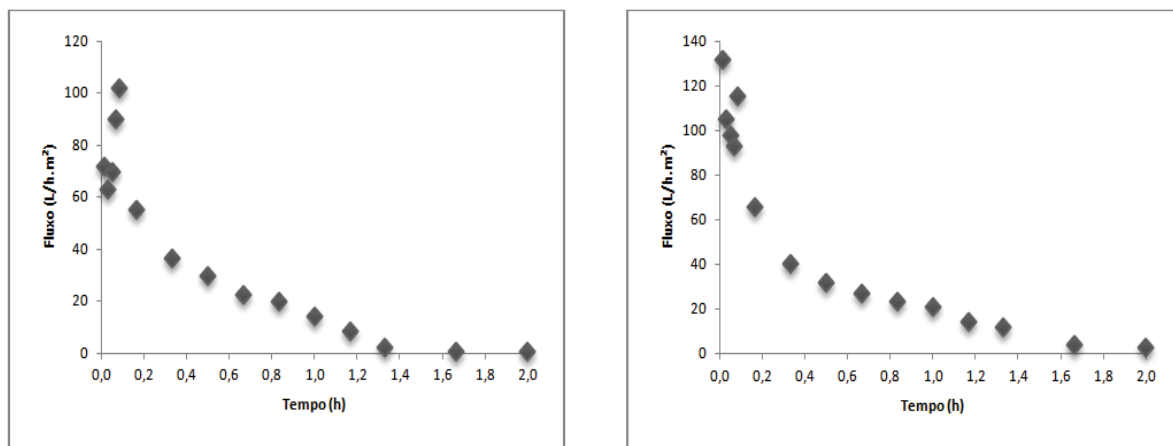


Figura 4: A: Fluxo de permeado do *Buttermilk* sem hidrólise; B: fluxo do permeado do *Buttermilk* com o processo de hidrólise (Alcalase + Neutrase).

O fluxo máximo atingido na filtração com *buttermilk* chegou a 112,6 L/h.m², havendo um forte decréscimo e atingindo 0,4 L/h.m² após 2 h, indicando o fenômeno de incrustação e colmatação da membrana. A rejeição de proteínas do *buttermilk* pela membrana de UF chegou a 87,55 % e não foi total, pois proteínas presentes com peso molecular < 30 kDa, permeiam os poros da membrana.

Já o fluxo máximo atingido com o *buttermilk* hidrolisado chegou a 132,5 L/h.m², tendo decréscimo significativo e atingindo 0,5 L/h.m² indicando também o fenômeno de incrustação e o término do processo. A rejeição de proteínas pela membrana de UF foi de 60,25 % demonstrando maior permeação das proteínas pela membrana, fato ocorrido pela redução do tamanho molecular das proteínas do *buttermilk* pelo processo de hidrólise enzimática.

A análise das composições (proteína, gordura e lactose), nas correntes de permeado e retido obtidas pelo processo de filtração, antes e após o processo de hidrólise enzimática está demonstrada nos quadros 3 e 4.

| Composição (%) | Alimentação (%) | Permeado (%) | Permeado Hidrolisado (%) |
|----------------|-----------------|------------------------|--------------------------|
| Proteína | 2,08±0,03 | 0,93±0,08 ^a | 1,28±0,09 ^b |
| Lactose | 1,76±0,04 | 0,91±0,09 ^a | 0,94±0,08 ^a |
| Gordura | 2,43±0,09 | 0,23±1,03 ^a | 0,24±0,08 ^a |

Quadro 3: Comparação das composições da corrente de permeado antes e após o processo de hidrólise enzimática. * 1. Resultados de média ± desvio padrão; letras diferentes em uma mesma linha correspondem à diferença significativa (p < 0,05) pelo Teste de Tukey;

| Composição (%) | Alimentação (%) | Retido (%) | Retido Hidrolisado (%) |
|----------------|-----------------|------------------------|------------------------|
| Proteína | 2,08±0,03 | 1,08±1,08 ^a | 0,78±1,02 ^b |
| Lactose | 1,76±0,04 | 0,62±1,12 ^a | 0,59±0,09 ^a |
| Gordura | 2,43±0,09 | 2,12±0,98 ^a | 2,18±0,05 ^a |

Quadro 4: Comparação das composições da corrente de retido antes e após o processo de hidrólise enzimática * 1. Resultados de média ± desvio padrão; letras

diferentes em uma mesma linha correspondem à diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey;

A composição de proteína na alimentação foi distribuída pelas correntes de permeado e retido, tendo maior concentração na corrente de permeado após o processo de hidrólise, fenômeno já esperado pela redução do seu tamanho molecular. Já na corrente de retido, percebe-se que o teor de proteína reduziu após o processo de hidrólise, comprovando também uma maior permeação das proteínas do *buttermilk*. Os resultados para lactose e gordura em ambos os casos foram semelhantes. Pelo diâmetro de corte da membrana, o teor máximo de gordura deveria permanecer no retido, porém uma pequena fração esteve presente no permeado.

Para avaliar a massa molecular dos peptídeos obtidos, as amostras de *buttermilk*, *buttermilk* hidrolisado com Alcalase + Neutrase, permeado e retido, foram submetidas à eletroforese e são analisadas na figura 5:

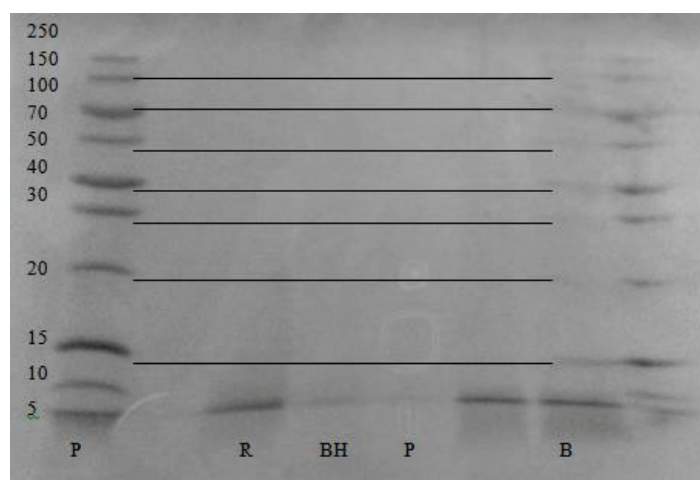


Figura 5: Perfil eletroforético das amostras analisadas. Legenda: Primeira banda: perfil eletroforético do padrão (2 a 250 kDa) – (P); Segunda banda: desconsiderado; Terceira banda: perfil eletroforético do retido – (R); Quarta banda: perfil eletroforético do *buttermilk* hidrolisado - (BH); Quinta banda: perfil eletroforético do permeado – (P); Sexta banda: desconsiderado; Sétima banda: perfil eletroforético do *buttermilk* - (B).

Podemos observar o perfil eletroforético do *buttermilk* (B) como referência. A amostra sem sofrer processo de hidrólise apresenta variações de tamanhos moleculares entre 13 e 130 kDa (a primeira marcação de 5 kDa é desconsiderada).

A banda eletroforética B mostra que apenas a proteína do *buttermilk* continha as proteínas MFGM. Após a hidrólise enzimática, as proteínas e caseínas derivadas de MFGM foram lizadas em todas as amostras. Todas as proteínas que foram hidrolisadas apresentaram peptídeos menores que 5 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).

Foram obtidos valores variáveis para o CMC, conforme utilizadas as enzimas selecionadas, como mostra o quadro 5.

| Enzima | Tempo (h) | Média (GH) | Comprimento médio das cadeias (Nº de resíduos) | Massa molecular média (kDa) |
|-------------------|-----------|------------|--|-----------------------------|
| <i>Buttermilk</i> | - | - | 100 | 12.000,00 |

| | | | | |
|------------------------|-----|-------|--------|----------|
| Alcalase | 2,5 | 25,8 | 3,968 | 476,190 |
| Prolyve | 3,5 | 25,2 | 3,968 | 476,190 |
| Neutrase | 1,8 | 5,8 | 17,241 | 2068,966 |
| Lypaine | 5,3 | 0 | - | - |
| Alcalase + Neutrase | 4,3 | 34,02 | 2,939 | 0,352 |

Quadro 5: CMC nos tempos finais das hidrólises enzimáticas de cada enzima utilizada.

Houve decréscimo progressivo no comprimento das cadeias e na massa molecular média à medida em que o GH aumentou. O CMC final utilizando as enzimas Alcalase + Neutrase, foi de 2,939.

4 Discussão

Avaliando separadamente, a enzima Alcalase apresentou GH máximo de 25,8% em 2h. Sabe-se que essa enzima hidrolisa principalmente ligações peptídicas contendo resíduos hidrofóbicos no lado carboxílico (ADLER-NISSEN, 1986). Adamson e Reynolds (1996) verificaram que, na hidrólise de caseína, a Alcalase® hidrolisava preferencialmente ligações peptídicas contendo resíduos de Glu, Met, Leu, Tyr, Lys e Gln no lado carboxílico. Segundo Pessato (2014), o GH variou de 18,1 a 23,9%. Perea et al. (1993) com o soro de leite, obtiveram 16 % e 20 % de GH para as frações purificadas de α -La e β -Lg respectivamente, utilizando a mesma concentração enzima:substrato utilizada neste trabalho, mostrando que o GH atingido neste trabalho está enquadrado nos encontrados pela literatura.

A enzima Prolyve chegou a um GH de 25,8% mas somente em 3,5h. Endoprotease muito semelhante à Alcalase apresenta diferente sequência de aminoácidos (BEYNON E BOND, 1989; WHITAKER, 1994).

O maior GH encontrado para a enzima Neutrase foi de 5,89 % em 1,8 h. Maiores tempos não foram atribuídos por já saber que a Neutrase atua removendo aminoácidos ou pares de aminoácidos a partir dos terminais da cadeia polipeptídica e é pouco eficiente na degradação de proteínas intactas sendo indicado o seu uso após ou em conjunto com uma endoprotease (PAWLETT E BRUCE, 1996).

A enzima Lypaine foi descartada do processo por após 5,3 h não demonstrar alterações no pH, ou seja, não houve atividade enzimática. Esta enzima também é endopeptidase, porém de origem vegetal, preparada através da papaína purificada. É uma proteinase de cisteína que degrada frações proteicas principalmente da cerveja (LYVEN, 2016). Esta enzima foi descartada do processo por após 5,3 h não demonstrar alterações no pH, ou seja, não houve atividade enzimática. Isto se explica por esta enzima não ser indicada para proteínas lácteas.

Optou-se então pelo uso simultâneo das enzimas Alcalse e Neutrase, com a premissa de que a Alcalase atua nas regiões internas das cadeias polipeptídicas, quebrando as ligações com resíduos de aminoácidos aromáticos, ácidos, sulfurados, alifáticos, hidroxil e básicos no lado carboxílico. Já a Neutrase, atua nas regiões externas, quebrando as ligações restantes de carboxi-terminais (aminoácidos aromáticos) e atuando também em aminoácidos hidrofóbicos e alifáticos. Sabendo que as exopeptidases catalisam a quebra das ligações peptídicas nas extremidades N ou C terminal das cadeias polipeptídicas e as endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas. Otte et al. (1997) testaram várias proteases na hidrólise de β -Lg, entre elas: bromelina, tripsina, endoproteinase, aminopeptidase e carboxipeptidase. As condições padrões de hidrólise foram 37°C e pH 8,

exceto para carboxipeptidase (pH 6,5). A β -Lg foi degradada rapidamente onde obtiveram peptídios de tamanho médio (1-5 kDa) e GH de 49 %.

Para Colbert e Decker 1989, a atividade antioxidante do *buttermilk* hidrolisado, expresso em porcentagem de inibição foi de 55,96 e 60,64%. Thompkin-filho e Mathur (1989) encontraram uma atividade antioxidante expressa em porcentagem de inibição de 12,22 % para o *buttermilk*, valor próximo ao encontrado neste trabalho.

Conforme confirmado pela eletroforese, o *buttermilk* continha grandes quantidades de proteínas de MFGM. Britten et al. (2012) relataram que as proteínas MFGM são responsáveis por até 19% da proteína total no *buttermilk*. Chen et al. (2008) sugeriram a contribuição dessas proteínas para a capacidade antioxidante. Também segundo os autores, peptídeos originários das principais proteínas do soro de leite (α -lactalbumina e β -lactoglobulina) são responsáveis também pela atividade antioxidante. As caseínas são mais antioxidantes que as proteínas do soro de leite, provavelmente devido à sua capacidade em sequestrar ferro e pelos resíduos de fosfoseril na superfície das micelas de caseína (RIES et. a., 2010).

O fluxo inicial de permeado foi de 132,5 L/hm² e foi superior ao fluxo de permeado não hidrolisado (112,6 L/h.m²), indicando que a hidrólise reduziu o tamanho das proteínas, mesmo nos primeiros minutos da reação. Cheison, Wang e Xu (2007), afirmam que altas taxas de recuperação de proteína no permeado estão intimamente relacionadas ao seu transporte pela membrana, e são também favorecidas pela concentração da enzima, já que a hidrólise aumenta a permeação do produto. Leindecker (2011), comprova que a membrana UF de massa molar de corte de 10 kDa apresenta a maior retenção de proteínas comparada com membranas de 30 e 50 kDa. Atra et al. (2005) utilizaram uma membrana com menor massa molar de corte (6-8 kDa) e uma pressão de 1 bar, atingindo rejeições de proteína de 92-98 % quando ultrafiltraram proteínas do soro de leite. Diferentes tipos de *buttermilk* possuem variações em sua composição o que pode levar a pequenas diferenças de rejeições. No entanto, a alta rejeição das proteínas do *buttermilk* pela membrana mostram que elas possuem maior peso molecular, havendo a oportunidade para serem hidrolisadas e produzir peptídeos com bioatividade.

A composição do *buttermilk* após o processo de hidrólise confirmou a redução do tamanho molecular das proteínas e uma maior permeação pela membrana. Roesch e Corredig (2002) obtiveram um aumento lipídico total de 8 % a 16 % no retentado final após hidrólise e UF enquadrando os valores deste estudo. Barry et. al., (2017) hidrolisaram o *buttermilk* combinando Neutrase e Alcalase e apenas Alcalase visando determinar a enzima proteolítica de melhor ação enzimática. Concluiu que um GH de 19% digere proteínas do *buttermilk* suficientemente para permitir a permeação através de uma membrana de UF de 50 kDa. Houve passagem de gordura no permeado, a gordura remanescente no *buttermilk* possui maior teor de gordura livre (Mulder e Walstra, 1974). Portanto, mais gordura foi transferida através da membrana. A gordura livre não pode ser separada por desnatadeiras e as moléculas são provavelmente muito pequenas para serem retidas pelas membranas UF.

Para a eletroforese, Abdelmoneim et. al., (2018) encontraram valores próximos e explicaram as diferenças moleculares da seguinte forma: α -lactoblobulina entre 10 a 15 kDa; β -lactoblobulina entre 15 e 20 kDa; Caseínas (β , α , e κ) entre 20 e 40 kDa e acima de 50 kDa proteínas do MFGM (butirofilina, xantina oxidase e desidrogenase). A butirofilina é uma glicoproteína que representa mais de 40 % da massa de proteínas totais da MFGM. Já a xantina oxidase representa 12 % da massa de proteínas totais. Sabadin, Villas-Boas, Zollner et al. (2012) relataram peptídeos de MM menor que 6,5 kDa em hidrolisados de β -Lg produzidos com Alcalase livre que apresentaram cerca de 12 % de GH. Doucet, Otter, Gauthier (2003) relataram formação de peptídeos menores que 2 kDa a partir da hidrólise com Alcalase por 5 h.

O CMC variou conforme o GH. Para a hidrólise com Alcalase + Neutrase, no seu tempo final, obteve-se o valor de 2,939 indicando que, em média, os peptídeos formados são di e tripeptídeos. Guadix et al. (2006) relatam resultados para soro de leite 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), também para soro de leite, obtiveram resultados de 0,635 kDa 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 1 kDa.

Conclusão

Peptídeos de baixo peso molecular obtidos do *buttermilk*, apresentam propriedade bioativa, comprovando sua atividade antioxidante com melhores valores quando submetido à hidrólise enzimática com Alcalase e Neutrase e submetido ao um biorreator de membranas, tornando viável seu reaproveitamento.

ACKNOWLEDGMENT

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Referências

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

ARAUZ, Luciana Juncioni de. Produção de nisina em leite desnatado diluído por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 em biorreator. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ASTAIRE, JC et al. Concentração de lipídios polares de MFGM a partir de *buttermilk* por microfiltração e extração com fluido supercrítico. *Journal of dairy science*, v. 86, n. 7, p. 2297-2307, 2003.

BARRY, Kate M .; DINAN, Timothy G .; KELLY, Philip M. Produção em escala piloto de um ingrediente lácteo enriquecido em fosfolipídios por meio de um processo integrado otimizado empregando hidrólise enzimática, ultrafiltração e extração de fluido supercrítico. *Ciência Alimentar Inovadora e Tecnologias Emergentes*, v. 41, p. 301-306, 2017.

BRITTEN, M.; LAMOTHE, S.; ROBITAILLE, G. Effect of cream treatment on phospholipids and protein recovery in butter-making process. *International journal of food science & technology*, v. 43, n. 4, p. 651-657, 2008.

CHEN, Jun et al. Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. *International dairy journal*, v. 13, n. 12, p. 927-935, 2003.

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.

DOUCET, D., OTTER, D. E., GAUTHIER, S. F., *et al.* Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: Peptide Identification and Determination of Enzyme Specificity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 21, p. 6300-6308. 2003.

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.

LEINDECKER, G. C. Separação das proteínas do soro do leite in natura por ultrafiltração. Monografia (Formação em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

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.

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

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.

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.

RIES, D. *et al.* Antioxidant properties of caseins and whey proteins in model oil-in-water emulsions. *International Dairy Journal*, v. 20, n. 2, p. 72-78, 2010.

SABADIN, I., VILLAS-BOAS, M., ZOLLNER, R. L., *et al.* Effect of combined treatment of hydrolysis and polymerization with transglutaminase on β -lactoglobulin antigenicity. *European Food Research and Technology*, v.235, n.5, p.801-809. 2012.

SPITSBERG, Vitaly L.; IVANOV, Liza; SHRITZ, Vladimir. Recovery of milk fat globule membrane (MFGM) from buttermilk: effect of Ca-binding salts. *Journal of Dairy Research*, v. 86, n. 3, p. 374-376, 2019.

VERDI, K. Produção de peptídeos de soro de leite em Reator Enzimático de Membrana: perfil molecular, atividade biológica e atributos de sabor. Qualificação (mestrado em ciência e tecnologia de alimentos), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2017.

YOUNG, Denise; TSAO, Rong; MINE, Yoshinori. Nutraceuticals and antioxidant function. *Functional foods, nutraceuticals, and degenerative disease prevention*, p. 75-112, 2011.

1. Métodos Suplementares

Caracterização dos peptídeos

Para polimerização do gel de corrida foram utilizadas soluções de dois monômeros (acrilamida/bis) em duas diferentes concentrações: 5 % e 3 % no gel de aplicação da amostra 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 160 V 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.

Atividade antioxidante

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 µM diluídas em álcool etílico, as quais reagiram com a solução de radical ABTS•+ (na proporção de 10 µL:1 mL, respectivamente) durante 6 minutos, e a absorbância lida à 734 nm.

A atividade antioxidante foi expressa em 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:

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

Onde *Abs 734nm* é a absorbância da amostra lida a 734 nm. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata.

2. Resultados Suplementares

Comprimento médio das cadeias e massa molecular média

5) Alcalase

| Tempo (h) | Média (GH) | Comprimento médio das cadeias (Nº de resíduos) | Massa molecular média (kDa) |
|-----------|------------|--|-----------------------------|
| 0,2 | 2,1 | - | - |
| 0,3 | 4,4 | 22,727 | 2727,273 |
| 0,5 | 5,9 | 16,949 | 2033,898 |
| 0,7 | 13,8 | 7,246 | 869,565 |
| 0,8 | 16,9 | 5,917 | 710,059 |

| | | | |
|-----|-------|-------|---------|
| 1,0 | 18 | 5,556 | 666,667 |
| 1,2 | 19,12 | 5,230 | 627,615 |
| 1,3 | 20,6 | 4,854 | 582,524 |
| 1,5 | 21,9 | 4,566 | 547,945 |
| 1,7 | 22,58 | 4,429 | 531,444 |
| 1,8 | 23,1 | 4,329 | 519,481 |
| 2,0 | 23,15 | 4,320 | 518,359 |
| 2,2 | 24,6 | 4,065 | 487,805 |
| 2,3 | 25,1 | 3,984 | 478,088 |
| 2,5 | 25,8 | 3,968 | 476,190 |

6) Prolyve

| Tempo (h) | Média (GH) | Comprimento médio das cadeias (Nº de resíduos) | Massa molecular média (kDa) |
|-----------|------------|--|-----------------------------|
| 0,2 | 1,2 | - | - |
| 0,3 | 1,98 | 50,505 | 6060,606 |
| 0,5 | 2,5 | 40,000 | 4800,000 |
| 0,7 | 2,98 | 33,557 | 4026,846 |
| 0,8 | 3,15 | 31,746 | 3809,524 |
| 1,0 | 4,6 | 21,739 | 2608,696 |
| 1,2 | 5,9 | 16,949 | 2033,898 |
| 1,3 | 12,5 | 8,000 | 960,000 |
| 1,5 | 13,5 | 7,407 | 888,889 |
| 1,7 | 16,8 | 5,952 | 714,286 |
| 1,8 | 18,2 | 5,495 | 659,341 |
| 2,0 | 18,9 | 5,291 | 634,921 |
| 2,2 | 19,45 | 5,141 | 616,967 |
| 2,3 | 20,45 | 4,890 | 586,797 |
| 2,5 | 23,45 | 4,264 | 511,727 |
| 2,7 | 23,98 | 4,170 | 500,417 |
| 2,8 | 24,89 | 4,018 | 482,121 |
| 3,0 | 25,2 | 3,968 | 476,190 |
| 3,2 | 25,4 | 3,937 | 472,441 |
| 3,3 | 25,36 | 3,943 | 473,186 |
| 3,5 | 25,2 | 3,968 | 476,190 |

7) Neutrase

| Tempo (h) | Média (GH) | Comprimento médio das cadeias (Nº de resíduos) | Massa molecular média (kDa) |
|-----------|------------|--|-----------------------------|
| 0,2 | 1,96 | - | - |
| 0,3 | 1,98 | 50,505 | 6060,606 |
| 0,5 | 2,51 | 39,841 | 4780,876 |
| 0,7 | 3,91 | 25,575 | 3069,054 |

| | | | |
|-----|------|--------|----------|
| 0,8 | 4,2 | 23,810 | 2857,143 |
| 1,0 | 4,84 | 20,661 | 2479,339 |
| 1,2 | 5,23 | 19,120 | 2294,455 |
| 1,3 | 5,4 | 18,519 | 2222,222 |
| 1,5 | 5,6 | 17,857 | 2142,857 |
| 1,7 | 5,79 | 17,271 | 2072,539 |
| 1,8 | 5,8 | 17,241 | 2068,966 |

8) Lypaine

| Tempo (h) | Média (GH) | Comprimento médio das cadeias (Nº de resíduos) | Massa molecular média (kDa) |
|-----------|------------|--|-----------------------------|
| 0,2 | 0 | - | - |
| 1,0 | 0 | - | - |
| 2,0 | 0 | - | - |
| 3,0 | 0 | - | - |
| 4,0 | 0 | - | - |
| 5,0 | 0 | - | - |
| 5,3 | 0 | - | - |