



Área: Engenharia de Alimentos

CLIVAGEM E SEPARAÇÃO DE PEPTÍDEOS DE *BUTTERMILK* BUSCANDO BIOATIVIDADE

Guilherme Otávio Moraes Giubel*, Sandrini Slongo Fortuna, Jéssica Stefanello Cadore, Vandrê Barbosa Brião

Laboratório de Operações Unitárias, Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS

*E-mail: 163325@upf.br

RESUMO – A produção de manteiga gera 6.10⁶ toneladas por ano de *buttermilk* em todo o mundo. Este subproduto possui nutrientes como proteínas, lactose e minerais. As proteínas, quando clivadas à 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. As enzimas Alcalase® e Neutrase® utilizadas em sequência apresentaram melhor ação chegando a um grau de hidrólise (GH) de 34 %. A separação do *buttermilk* hidrolisado pela membrana de ultrafiltração, com condições de 1 bar de pressão, por duas horas e temperatura de 40°C, permitiu a separação dos peptídeos menores, rejeitando as moléculas de proteínas em 60,25 %. As amostras hidrolisadas e ultrafiltradas apresentaram bioatividade, que apresentou maior atividade antioxidante (834,21±2,40 µmol TE/g de proteína). 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: Bioatividade; Ultrafiltração; Proteínas; Enzimas; Laticínios.

1 INTRODUÇÃO

Buttermilk é considerado um subproduto complexo, o qual é liberado durante o batimento da produção de manteiga e contém proteínas, lipídeos, oligossacarídeos, fosfolipídios, glicolipídeos, glicoproteínas e muitos componentes com atividades biológicas em que particularmente as proteínas, quando clivadas à peptídeos, apresentam grande atividade biológica (ASTAIRE et al., 2003), destacam que a produção mundial de *buttermilk* é de 6,5 x 10⁶ toneladas anuais, sendo um importante candidato à conquista do mercado alimentício.

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 (GOLKAR et al., 2019).

O processo de separação por membranas, utilizando a membrana de ultrafiltração, operando juntamente com a hidrólise enzimática, permite operar em etapas de transformação e separação, chamado de biorreator de membrana. A hidrólise enzimática possibilita a clivagem das proteínas, enquanto a ultrafiltração permite realizar a separação do produto. A literatura traz diversos trabalhos envolvendo o uso combinado desses processos para a produção de peptídeos, utilizando proteínas do soro de leite (VERDI, 2017), leite (ARAUZ, 2011), tratamento supercrítico no *buttermilk* (GÁRCIA-CANO et al., 2020) 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).

Este estudo visou obter peptídeos de baixo peso molecular a partir do *buttermilk* em um biorreator de membrana, aplicando ultrafiltração seguida de hidrólise enzimática, separando os peptídeos de baixo peso molecular por ultrafiltração e avaliando a bioatividade dos peptídeos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização do *buttermilk*

O *buttermilk* foi fornecido pela empresa Randon S.A (Vacaria – RS, Brasil), coletado um dia antes dos experimentos. A caracterização 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 em base úmida, 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

Os ensaios de hidrólise proteica foram realizados por bateladas e em triplicata. Os reatores foram béqueres de 2000 mL, colocados sob agitadores magnéticos com aquecimento (marca FISATOM, modelo 501). 1000 mL de *buttermilk* foram adicionados no béquer e, após, um volume de enzima específico foi adicionado de acordo com as indicações do fabricante. Sob constante agitação, o pH foi ajustado conforme necessidade com NaOH 0,1 molar ou ácido láctico 0,5 molar e temperatura específicos de cada enzima.

A agitação permaneceu constante e o término da hidrólise foi definido pelo método pH-stat, onde, havendo estabilidade nos valores de pH, deu-se por encerrado o processo de hidrólise. A reação foi interrompida com aquecimento à 90 °C por 30 s, temperatura de inativação enzimática (segundo o fabricante).

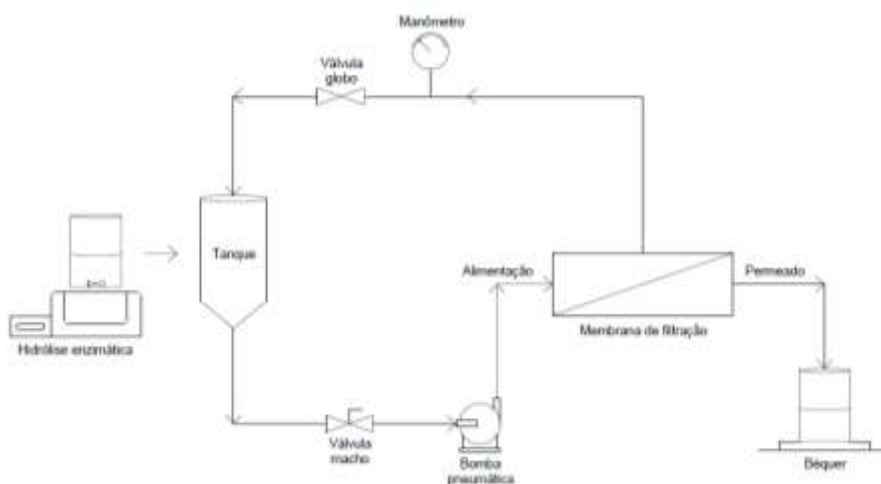
As enzimas utilizadas foram a endoprotease Alcalase® (EC3.4.21.62) e metaloprotease Neutrase® (EC3.4.22), da Novozymes (Bagsværd, Dinamarca), e cedidas gentilmente pela empresa LNF Latino Americana (Brazil).

2.3 Operação do biorreator de membrana

O biorreator de membrana operou em batelada, sendo primeiro realizada a hidrólise enzimática das proteínas, e, após, passando o *buttermilk* hidrolisado ao sistema de separação. A separação dos peptídeos por UF foi realizada por uma membrana (Koch Membrane Systems) polimérica (poliacrilonitrila) de configuração tubular, com área efetiva de 0,1 m² e massa molar de corte na faixa de 30 a 80 kDa (segundo o fabricante), em equipamento piloto fornecido pela WGM Sistemas (São Paulo, Brasil).

A membrana foi submetida à limpeza química com solução de NaOH (pH 11) e enxágue com água mili-Q antes de cada experimento. O *buttermilk* hidrolisado à 40°C foi alimentado no equipamento de separação por membrana disposto em Figura 1. A pressão utilizada foi de 1 bar. O tempo total de operação variou entre duas e quatro horas, e o tempo total do processo variou entre seis e oito horas. O permeado era retirado e o retido recirculado para o tanque.

Figura 1: Diagrama esquemático do processo de hidrólise e separação dos peptídeos no biorreator de membrana.



Fonte: Autores (2021).

2.4 Caracterização dos peptídeos

Os peptídeos foram caracterizados pela estimativa do comprimento médio da cadeia, massa molecular média, e por eletroforese em gel. A bioatividade avaliada dos peptídeos foi a atividade antioxidante.

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.

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



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

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 cm x 8 cm e espessura de 1,0 mm.

2.4 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•+, 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.

2.5 Análise dos dados

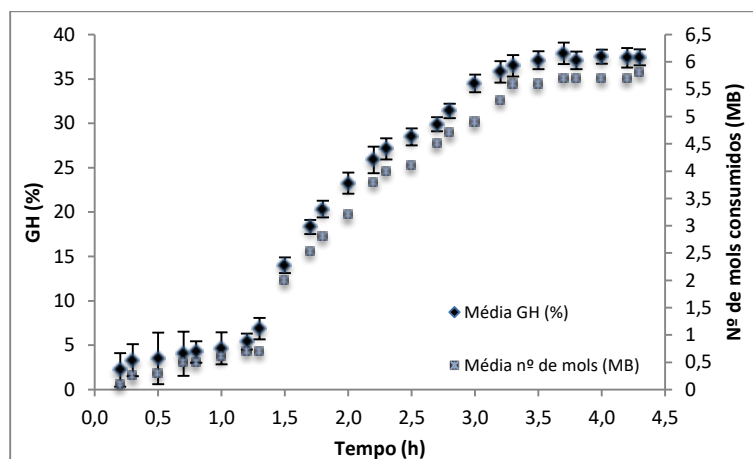
Os resultados obtidos foram expostos à análise estatística através da Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey, a 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As enzimas Alcalase® e Neutrase atingiram respectivamente, os seguintes GH: 25,8%, 5,89%. 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 neutrase é mais ativa em pH neutro e possui regiões de α -hélice (38%) e de β -folha pregueada (17%). 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 mais elevado, atingindo o seu máximo em 34,02%.

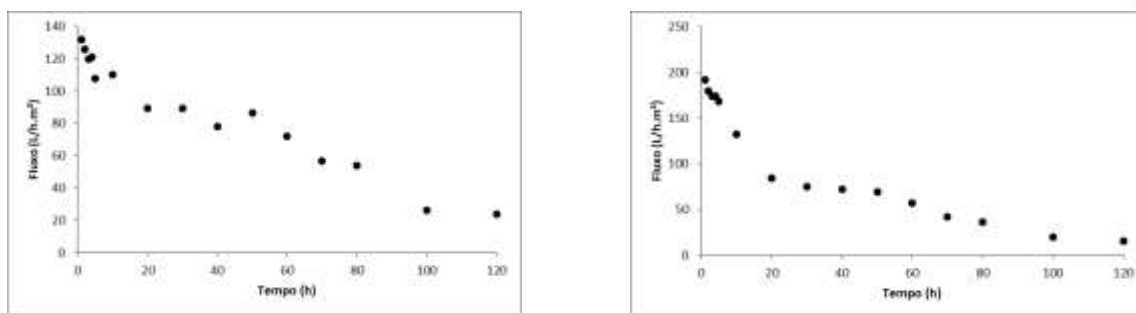
Figura 2: Grau de Hidrólise (GH) e mols consumidos de NaOH das enzimas selecionadas.



Após a hidrólise proteica realizada com a sequência das enzimas Alcalase e Neutrase, realizamos novo experimento nessas condições e operando o biorreator de membrana. Para comparação, também realizamos a operação do biorreator de membrana com o *buttermilk*. Os fluxos permeados ao longo do tempo dos experimentos se encontram na Figura 4.



Figura 3: Fluxo de permeado operando o biorreator de membrana com A) *Buttermilk* sem hidrólise; B) *Buttermilk* hidrolisado sequencialmente com as enzimas Alcalase e Neutrase. Pressão: 101 kPa, T = 40 °C.



O fluxo inicial do *buttermilk* hidrolisado foi maior (192 L/h.m²), havendo um forte decréscimo e atingindo 15 L/h.m² após 120 min de operação. Por outro lado, a operação do biorreator de membrana com o *buttermilk* apresentou um fluxo inicial menor, mas o forte decréscimo também ocorreu, e após 120 min de operação o fluxo era de 24 L/h.m²). A rejeição de proteínas pelo biorreator de membrana também foi diferente para as duas situações. A rejeição de proteínas do *buttermilk* pela membrana de UF chegou a 87,55 % e não foi total, enquanto a rejeição das proteínas do *buttermilk* hidrolisado foi de 60,25%. Isso demonstra que a hidrólise reduziu o tamanho das proteínas do *buttermilk* de modo que houve uma maior permeação dessas proteínas pela membrana.

A composição de 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 na Tabela 1.

Tabela 1: Composições das correntes de alimentação, permeado e retido do processo de ultrafiltração do *buttermilk* e do *buttermilk* hidrolisado * 1. Resultados de média $\pm$ desvio padrão; letras diferentes em uma mesma coluna correspondem à diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Amostra	Correntes	Proteína (%)	Lactose (%)	Gordura(%)
Buttermilk	Alimentação	2,08 $\pm$ 0,03	1,76 $\pm$ 0,04	2,43 $\pm$ 0,09
	Permeado	0,93 $\pm$ 0,08 ^a	0,91 $\pm$ 0,09 ^a	0,23 $\pm$ 1,03 ^a
	Retido	1,08 $\pm$ 1,08 ^a	0,62 $\pm$ 1,12 ^a	2,12 $\pm$ 0,98 ^a
Buttermilk hidrolisado	Alimentação	2,08 $\pm$ 0,03	1,76 $\pm$ 0,04	2,43 $\pm$ 0,09
	Permeado	1,28 $\pm$ 0,09 ^b	0,94 $\pm$ 0,08 ^a	0,24 $\pm$ 0,08 ^a
	Retido	0,78 $\pm$ 1,02 ^b	0,59 $\pm$ 0,09 ^a	2,18 $\pm$ 0,05 ^a

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. Esse 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.

A atividade antioxidante foi proporcional ao GH, e quanto maior o GH, maior a AA, como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2: Atividade antioxidante do *buttermilk*, hidrolisados e permeado e retido do biorreator de membrana. GH: Grau de Hidrólise; AA: atividade antioxidante. * 1. Resultados de média $\pm$ desvio padrão; letras diferentes em uma mesma coluna correspondem à diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Enzima	Tempo (h)	Média (GH)	AA (μ mol TE/g de proteína)
<i>Buttermilk</i>	-	-	396,81 $\pm$ 3,95 ^a
Alcalase	2,5	25,8	803,58 $\pm$ 1,57 ^b
Prolyve	3,5	25,2	795,73 $\pm$ 5,66 ^b
Neutrase	1,8	5,8	418,82 $\pm$ 4,16 ^a
Lypaine	5,3	0	406,49 $\pm$ 5,35 ^a
Alcalase + Neutrase	4,3	34,02	834,21 $\pm$ 2,40 ^b
Permeado	-	-	956,87 $\pm$ 1,57 ^c
Retido	-	-	825,48 $\pm$ 3,12 ^b

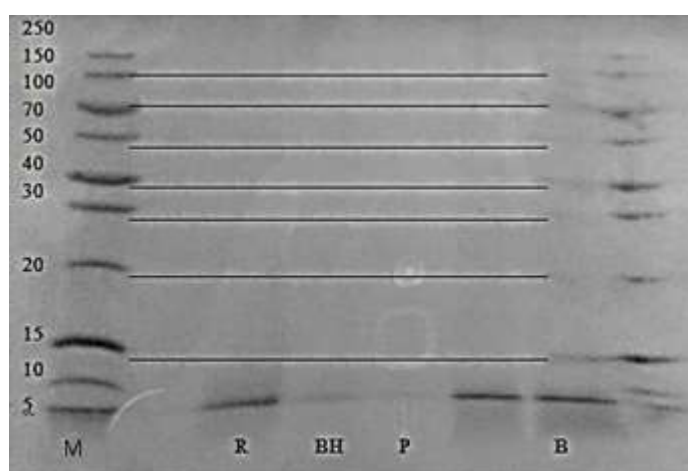


Todas as amostras hidrolisadas mostraram aumento na atividade antioxidante quando comparadas com o *buttermilk* não hidrolisado.

Os maiores valores obtidos para o grau de hidrólise 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

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 apresentadas na Figura 4.

Figura 4: Análise de eletroforese em gel das amostras de *buttermilk*. Legenda: M: Marcadores padrão (5 a 250 kDa) R: Retido – (R); BH: *buttermilk* hidrolisado P: Permeado; B: *buttermilk*.



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

A Tabela 3 mostra o comprimento médio das cadeias estimado para cada amostra de *buttermilk* hidrolisada.

Tabela 3: Comprimento média das cadeias proteicas e massa molecular média estimados do *buttermilk* e do *buttermilk* hidrolisado.

Enzima	Tempo (h)	Média (GH)	Comprimento médio das cadeias (Nº de resíduos)	Massa molecular média (kDa)
Buttermilk	-	-	100	12.000,00
Alcalase	2,5	25,8	4,0	483,22
Neutrase	1,8	5,8	17,2	2068,97
Alcalase + Neutrase	4,3	34,02	2,9	0,35

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 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 biorreator de membranas, tornando viável seu reaproveitamento.

O uso do *buttermilk* para produção de hidrolisados bioativos pode ser uma alternativa para recuperação desse subproduto, valorizando-o e ampliando os produtos oferecidos ao consumidor pela indústria de laticínios.



5 REFERÊNCIAS

- 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.
- 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.
- GOLKAR A., MILANI J.M., VASILJEVIC T. Alteração da alergenicidade do leite de vaca pelo processamento de alimentos para aplicações em fórmulas infantis, **Crit. Rev. Food Science Nutrition**, 59, pp. 159- 172, 2019.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- YOUNG, Denise; TSAO, Rong; MINE, Yoshinori. Nutraceuticals and antioxidant function. Functional foods, nutraceuticals, and degenerative disease prevention, p. 75-112, 2011.