
HIDRÓLISE DE SORO DE LEITE OVINO DIFILTRADO PELA ENZIMA COROLASE H-PH E AVALIAÇÃO DA GERAÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS

HYDROLYSIS OF DIAFILTRATED OVINE MILK WHEY BY H-PH COROLASE ENZYME AND EVALUATION OF BIOACTIVE PEPTIDE GENERATION

Daiane Preci¹ Mateus Baptista Nunes¹ Ilizandra A. Fernandes¹
Bruna Seguenka¹ Eunice Valduga¹ Juliana Steffens¹ Clarice Steffens¹

Resumo: O objetivo deste trabalho foi obter um diafiltrado de soro de leite ovino e avaliar o efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática da protease corolase H-pH. Também se investigou o grau de hidrólise da protease (corolase H-pH) em diferentes tempos (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h) e também a massa molecular média e comprimento médio da cadeia peptídica das amostras. O pH e a temperatura influenciaram significativamente a atividade enzimática, sendo indicado o pH 8 e a temperatura de 60°C. O hidrolisado em 1 h de reação apresentou o maior número de péptidos em intervalo de 300 a 500 m/z (23,28%). Também foi encontrado maiores percentuais de peptídeos na faixa de 4.000 m/z (13,77%) e 5.000 m/z (4,59%) em com o tempo de 5 h de hidrólise que apresentou valores de 11.99 e 1.75%, respectivamente. Além disso, os péptidos ≥ 12.000 m/z foram reduzidos em 49,04% em tempo de hidrólise de 5 h. Nas faixas mencionadas, o número de peptídeos foi superior em 1 h de hidrólise e poderiam estar relacionados ao destaque frente as propriedades bioativas como atividade antioxidante e antimicrobiana. As diferenças na distribuição do número de peptídeos em toda faixa investigada (300 – 20.000 m/z) em MALDI-TOF, foi alterada com o tempo de hidrólise, o que pode ter contribuído para degradação das sequências péptidas ativas das moléculas. O concentrado proteico de soro de leite ovino diafiltrado (solução 10% (p/v) em 60°C, pH 8,0) hidrolisado com enzima corolase H-pH (1% baseado no conteúdo proteico) em 1 h de reação, é recomendado como ideal para a obtenção de peptídeos.

Palavras-chaves: soro de leite. peptídeos bioativos. hidrólise. enzima.

Abstract: The objective of this work was to obtain a diafiltrate of sheep whey and to evaluate the effect of temperature and pH on enzymatic activity of protease corolase H-pH. The degree of protease hydrolysis (corolase H-pH) at different times (1, 2, 3, 4, 5 and 6h) and also the average molecular weight and average peptide chain length of the samples were investigated. The pH and temperature influenced significantly the enzymatic activity, being indicated the pH 8 and the temperature of 60 °C. The hydrolyzate in 1 h of reaction presented the highest number of peptides in the range of 300 to 500 m/z (23.28%). peptides in the range of 4,000 m/z (13.77%) and 5,000 m/z (4.59%) at the 5 h hydrolysis time which showed values of 11.99 and 1.75%, respectively. m/z were reduced by 49.04% at 5 h hydrolysis time In the mentioned ranges, the number of peptides was higher in 1 h hydrolysis and could be related to the highlighting against bioactive properties such as antioxidant activity and antimicrobiana. differences in the distribution of the number of peptides throughout The investigated range (300 - 20,000 m/z) in MALDI-TOF was altered with hydrolysis time, which may have contributed to the degradation of the active peptide sequences of the molecules. The diafiltered sheep whey protein concentrate (10% (w / v) solution at 60 ° C, pH 8.0) hydrolysed with H-pH corolase enzyme (1% based on protein content) in 1 h reaction is recommended as ideal for obtaining peptides.

Keywords: whey. bioactive peptides. hydrolysis. enzyme.

¹ Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim/RS, email :
daiapreci@yahoo.com.br, mateus.baptistanunes@gmail.com, ilizandrafernandes@yahoo.com.
br, brunaseguenka@hotmail.com, veunice@uricer.edu.br, julisteffens@uricer.edu.br,
clarices@uricer.edu.br

1 Introdução

O soro de leite é obtido da fração líquida resultante da coagulação do leite e remoção de caseína na fabricação de queijo (ANTUNES, 2003; ATRA et al., 2005). Em comparação ao soro de leite bovino, o soro de leite ovino apresenta maior conteúdo proteico e corresponde em média a 20 % do total das proteínas encontradas no leite. Dentre as proteínas presentes em soro de leite encontram-se a beta-lactoglobulina (β -Lg) e a alfa-lactoalbumina (α -La), as quais correspondem a 70% das proteínas presentes e são as principais responsáveis pelas propriedades biológicas e funcionais, tais como capacidade emulsificante, solubilidade, entre outras (TRONCO, 2013).

No entanto, os fatores que dificultam o aproveitamento do soro são os elevados conteúdos de água, lactose e sais. Uma alternativa para a concentração do soro é o uso da ultrafiltração (UF), pois tem-se apresentado eficiente na preservação das propriedades proteicas do soro em virtude de não necessitar do uso de temperaturas elevadas. O emprego do processo de diafiltração, associado à ultrafiltração, tem contribuído para a redução nos teores de lactose e incremento no percentual de proteína (TSAKALI et al., 2015; ILTCHENCO et al., 2018).

As proteínas são nutricionalmente importantes devido ao fornecimento de aminoácidos essenciais (PIRES et al., 2006). Na ingestão de proteínas, os aminoácidos primários são hidrolisados por enzimas proteolíticas no trato gastrointestinal e liberam os chamados aminoácidos incomuns, fragmentos denominados de peptídeos bioativos, os quais estão criptografados dentro das proteínas do soro de leite e encontram-se inativos até a sua liberação (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011; JEEWANTHIKIM et al., 2017). Peptídeos bioativos podem ser definidos como componentes alimentares que independente das suas funções nutritivas desempenhe uma atividade de regulação no organismo humano (GOBBETTI et al., 2004). Estudos revelam que um incremento na atividade biológica pode ser constatada após a hidrólise das proteínas por via química, processo fermentativo ou tratamento enzimático (CORRÊA et al., 2014; JEEWANTHIKIM et al., 2017). A aplicação de enzimas tem apresentado maiores benefícios em detrimento ao uso de ácidos e bases, em virtude da preservação de aminoácidos, não exigência de remoção do sistema e por requererem quantidades menores para atuação. Além disso, hidrolisados proteicos a partir de enzimas, tem melhorado as propriedades nutricionais e funcionais (ALMEIDA et al., 2013; RAIZER et al. 2015). Reações de hidrólise proteica normalmente são catalisadas por enzimas proteolíticas, também conhecidas como proteases e proteinases. Enzimas proteolíticas classificam-se como hidrolases, por envolverem a água na hidrólise das proteínas, durante a reação ocorre a migração de componentes do substrato para a água (WHITAKER, 1994).

Os peptídeos derivados de soro de leite ovino podem apresentar atividades biológicas devido a homologia entre as proteínas bovinas, apesar disso, poucos peptídeos liberados a partir deste soro tem sido relatados (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011).

Frente a essas características a utilização de soro de leite ovino no setor alimentício poderia propiciar a agregação de valor através de sua incorporação como ingrediente. Pesquisas envolvendo essa temática voltada ao soro de leite da espécie ovina e com hidrolisados utilizando enzima H-pH ainda carece estudos. Nesse contexto, o objetivo geral do presente foi hidrolisar soro de leite ovino concentrado por diafiltração utilizando a enzima corolase H-pH e avaliar o grau de hidrólise em diferentes tempos e o perfil peptídico dos hidrolisados.

2 Materiais e Métodos

2.1 Concentração e caracterização do soro de leite ovino

Soro de leite ovino, da raça Lacaune, oriundo da elaboração de queijo colonial, cedido pela empresa Gran Paladare, localizada na cidade de Chapecó, SC foi utilizado para o presente estudo. O soro foi desnatado (gordura $\cong$ 1% em base seca) em desnatadeira (Casa das Desnatadeiras, modelo 09 GR Inox) e pasteurizado em pasteurizador de placas (Sotronic, modelo ST-SOTROLEITE) a 75°C/15 s, resfriado a 4°C em tanque inox (Sotronic, modelo ST-RLE). Posteriormente o soro de leite ovino desnatado (SLOD) foi submetido ao processo de separação com membranas, utilizando um sistema de filtração com capacidade de 120 L, com membrana de UF de poliamida (KOCH Membrane Systems, modelo 3838-K131-VYV), com configuração em espiral, massa molecular de corte de 10 kDa, área de filtração de 1,8 m² e pressão de 2,0 bar.

O fator de concentração volumétrico utilizado foi de 8. O fator de concentração volumétrico (FCV) é definido como sendo a razão entre o volume inicial da solução e o volume do concentrado (ou retido) como descrito na Equação 1 (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011).

$$FCV = \frac{V_0}{V_R} = \frac{V_0}{(V_0 - V_p)} \quad (1)$$

Onde, V_R é o volume de retido (concentrado) (L), V_0 é o volume inicial da solução (L), e V_p é o volume do permeado (L).

Os 12,5 L de concentrado proteico de soro de leite ovino (CPSLO) resultantes do processo de UF foram utilizados para o processo de diafiltração (DF) nas mesmas condições operacionais da UF. No entanto foi adicionado ao CPSLO, 100 L de água com alto grau de pureza e deixado permear 100 L. Este procedimento foi repetido por 3 vezes, ou seja, realizados 3 ciclos de lavagem utilizando 100 L de água em cada lavagem, assegurando que ao final do processo de DF permanecessem retidos os 12,5 L iniciais do processo, originando o concentrado proteico de soro de leite ovino diafiltrado (CPSLOD).

Amostras do SLOD, CPSLO e CPSLOD foram congelados a -80°C por 24 h em freezer vertical (Consul) acondicionadas em frascos de vidro de capacidade de 200 mL. Em seguida, as amostras foram desidratadas em liofilizador (Módulo 4K Freeze Dryer Edwards) a temperatura de -40°C por 48 h, para posterior caracterização.

As amostras do CPSLO e CPSLOD foram avaliadas quanto a solubilidade proteica, estabilidade das emulsões e proteína total. A solubilidade proteica foi determinada de acordo com o método de Morr et al. (1985). As amostras liofilizadas foram hidratadas em solução tampão fosfato de sódio pH 7,0 em temperatura ambiente, na concentração de 1 mg/mL e agitadas por 60 min em béquer com agitador magnético. Em seguida as amostras foram centrifugadas em centrífuga Sorvall ST8R Thermo Scientific a 10.000 g, durante 10 min a 4°C. O teor de proteína solúvel do sobrenadante foi determinado utilizando-se o método do ácido bicinonínico (BCA), considerado equivalente em sensibilidade ao método de Lowry, porém quanto ao preparo de reagentes apresenta maior facilidade. Este método baseia-se na reação de redução do cobre - Cu (II) $\rightarrow$ Cu (I), em meio alcalino, promovida pelas proteínas. O Cu (I), por sua vez, forma um complexo com o BCA, o qual absorve fortemente na região de 562 nm. Os valores obtidos foram substituídos na Equação 2. E as determinações realizadas em triplicata.

$$PS = \frac{C_s \cdot 50}{W \cdot \frac{S}{100}} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde: PS é o teor de proteína solúvel presente na amostra (%), C_s é concentração proteica no sobrenadante (mg/mL), W é o peso da amostra (mg), e S é a concentração de proteína na amostra (%).

Para determinação da estabilidade das frações, inicialmente, preparou-se emulsão de óleo em água na proporção de 25:75 (v/v), utilizando-se 15mL de solução tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 7,0) e 5 mL de óleo comercial (95% de óleo de girassol e 5% de óleo de milho) em uma concentração de proteína de 1,0 mg/mL. As emulsões foram preparadas a temperatura ambiente com um homogeneizador (Ultra-turrax T25 (IKA-Labortechnik, GmbH e Co, Staufen, Alemanha). A velocidade do rotor (S25N-10G, GmbH e Co. Staufen, Alemanha) foi de 20.000 rpm e o tempo de homogeneização de 1 min.

Posteriormente, a estabilidade das emulsões foi avaliada usando um analisador óptico vertical (Turbiscan Classic MA2000, Formulation, Toulouse, France). As emulsões preparadas foram colocadas em células cilíndrica de vidro (70 mm) para registrar os perfis de transmitância (T%) e a retrodispersão (RD %) em função da altura da célula. O estudo da cinética de desnaturação e desestabilização das emulsões foi realizado mediante a medida da retrodispersão a cada min durante um período de 60 min e uma medida única, transcorrido 24 h.

Os dados de RD (retrodispersão) a uma altura de 10 mm foram ajustados a Equação 3, de segunda ordem bifásica descrita por Panizzolo (2005).

$$RD(t) = \frac{RD_1}{(RD_1 K_1 t + 1)} + \frac{RD_2}{(RD_2 K_2 t + 1)} \quad (3)$$

Onde: K_1 e K_2 são as constantes de velocidade; RD_1 e RD_2 as porcentagens de retrodispersão a uma altura de 10 mm do tubo a um tempo t para cada término; K_1 e RD_1 correspondem as partículas maiores que são as que desnaturam mais rápido; e K_2 e RD_2 correspondem as partículas menores, as quais desnaturam mais lentamente segundo descrito pela Lei de Stokes.

A proteína total, foi determinada através do método de Kjeldahl, através do conteúdo de nitrogênio segundo a metodologia descrita pela AOAC (2005). O fator de multiplicação utilizado foi o de produtos lácteos que é de 6,38.

2.2. Determinação das condições ótimas de pH e temperatura na atividade enzimática da enzima

A protease comercial (Corolase H-pH), cedida pela Ab Enzymes foi escolhida para o presente trabalho, pois ainda não existem estudos com esta enzima para a hidrólise de soro de leite ovino. Segundo o fabricante a protease Corolase H-pH, atua em faixa de pH de 6 a 10 e temperatura de até 60°C. De acordo com De Wit (1998), existe uma relação entre pH e temperatura, em valores de pH superiores a 8,6, ocorre alterações nas propriedades físico-químicas das proteínas, ocorrendo uma desnaturação irreversível, enquanto que em pH neutro e temperaturas de até 70°C a desnaturação é reversível e em pH até 8,6 em temperaturas superiores a 80°C a estrutura nativa das proteínas não é alterada. Para verificar os efeitos do pH e da temperatura em relação a atividade enzimática foi efetuado um planejamento fatorial

completo 2² visando maximizar a hidrólise do soro de leite ovino (Tabela 2). A variável dependente (resposta) foi atividade enzimática.

Tabela 1 - Níveis e variáveis utilizados no planejamento fatorial 2² para avaliação da atividade enzimática no grau de hidrólise.

Variáveis Independentes	Códig os	Níveis		
		-1	0*	+1
pH	X ₁	6	7	8
Temperatura (°C)	X ₂	40	50	60

*triplicata de ponto central.

A variável fixa foi quantidade de enzima de 1% baseado no conteúdo proteico (quantidade de proteína presente na solução 10% (p/v) do CPSLOD), sendo a dosagem máxima indicada pelo fabricante. Os erlenmeyers com as amostras foram acondicionados em plataforma de agitação orbital (*shaker- ethik technology* - Ultitec, modelo 430 RD), agitados a 100 rpm e em diferentes tempos de reação (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h). Para avaliar a atividade enzimática, em cada tempo eram retiradas alíquotas de 0,750 mL de extrato enzimático.

2.3. Determinação da atividade enzimática da enzima Corolase H-pH

A atividade enzimática da enzima foi determinada através da metodologia de Dias et al. (2008), com adaptações. Inicialmente 1,5 mL de solução de caseína 0,5% (m/v, Synth) foi adicionadas em tampão Tris-HCl (*tris* (hidroximetil) aminometano cloridrato) 0,05 mol/L, pH 9,0, Synth), 0,750 mL de enzima e 0,150 mL de cisteína (Cys 10⁻²M) e ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA (4 x 10⁻³ M, Ohemis) em tubos de 50 mL, seguido de agitação por 5 s. Para o padrão (branco), utilizou-se 3 mL de caseína, 0,300 mL de cisteína e EDTA, e 1,5 mL de água destilada. Os tubos foram imersos em banho-maria (Quimis, modelo 0214M2) a 37°C durante 30 min. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (m/v) nas amostras e 3 mL de TCA no padrão. Os tubos foram centrifugados (Instruments-Biosystems. Modelo MPW-351R-MPW) a 10.000 rpm durante 25 min a 4°C. Os sobrenadantes foram adicionados em uma cubeta de quartzo e a leitura efetuada em espectrofotômetro (Pró-Análise modelo UV1600) a 275 nm.

Para determinar o equivalente em enzima liberado foi realizada uma curva padrão de acordo com *Food Chemicals Codex* (1996), e obtida a equação da reta. A atividade da enzima foi calculada de acordo com a Equação 4 (DIAS et al., 2008). A unidade foi expressa em µg/min/mL e foi definida como a quantidade de enzima (µg) produzida por minuto por 1 mL de extrato enzimático.

$$U/mL = \frac{\mu g \text{ Tyr} \times V_f}{V_a \times t} \quad (4)$$

Onde, µg Tyr é o valor obtido a partir da absorbância da amostra (obtido da curva padrão de tirosina); V_f é o volume total (em mL) de reagentes utilizados na análise; V_a é o volume da amostra (em mL) de extrato enzimático; t é o tempo (em min) de incubação.

2.4. Hidrólise enzimática

Com base nas melhores condições de atividade enzimática, obtida com planejamento fatorial 2² utilizando a enzima corolase H-pH, foram realizados ensaios de hidrólise utilizando

CPSLOD a 10% (p/v), e concentração de 1% de enzima, com tempos de reação de hidrólise de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h.

A hidrólise foi realizada em erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL da solução hidratada, acondicionados em incubadora com plataforma de agitação orbital (*shaker- ethik technology* - Ultitec, modelo 430 RD), aquecidos a 60°C e agitados a 100 rpm. Quando as amostras atingiram 60°C adicionou-se a enzima, permanecendo nestas condições, ao longo dos tempos investigados e então submetidas a inativação enzimática.

As amostras submetidas à hidrólise foram inativadas enzimaticamente em cada tempo (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h) em banho maria (Quimis, modelo 0214M2) a 75°C por 15 s. A inativação enzimática foi realizada de acordo com a metodologia de Dias et al. (2008). Alíquotas de 2 mL solução 10% (p/v) de CPSLOD e dos hidrolisados eram adicionadas em tubos de centrífuga com capacidade para 50 mL, juntamente com 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) (Merck) a 10%. Para o teste padrão substituiu-se a amostra por água destilada. As amostras e o padrão foram centrifugados a 10.000 rpm por 25 min, a 4°C e os sobrenadantes submetidos a leitura em espectrofotômetro (Pró-Análise, UV 1600) em 125 nm. O resultado do teste positivo para inativação foi dado pela manutenção dos valores de absorbância obtidos entre as amostras antes e após inativação pelo calor, demonstrando assim, que não houve liberação de tirosina pela enzima.

O grau de hidrólise foi avaliado de acordo com a metodologia da AOAC (2005). Inicialmente, adicionou-se 5 mL da amostra de hidrolisado do CPSLOD (solução 10% p/v), em erlenmeyer de 125 mL, com o pH ajustado para 7,0 com hidróxido de sódio (0,2 mol/L NaOH, Vetec) ou com o ácido clorídrico (0,2 mol/L HCl, Synth) e 5 mL da solução de formol-fenolftaleína (pH 7,0 Nuclear), e 3 gotas de fenolftaleína 1%. O conteúdo do erlenmeyer foi então titulado com NaOH (0,2 mol/L) até viragem da cor para rosa claro e o volume (V_1) registrado. O mesmo volume gasto na primeira titulação foi então acrescentado como excesso, tornando a coloração rosa intenso e o volume (V_2) registrado. A solução foi novamente titulada, porém com HCl (0,2 mol/L) até desaparecimento da cor rosa (retrotitulação) e o volume (V_3) registrado. A quantidade de NaOH gasto na titulação (X) e a quantidade de HCl gasto na retrotitulação (Y), foram obtidas por meio das Equações 5 e 6:

$$X = \frac{(Fc \text{ NaOH}) (V_1 + V_2)}{1000\text{mL}} \quad (5)$$

$$Y = \frac{(Fc \text{ HCl}) (V_3)}{1000\text{mL}} \quad (6)$$

Onde, V_1 é o volume gasto (mL) na primeira titulação com NaOH 0,2 mol/L; V_2 é o mesmo volume gasto na primeira titulação; V_3 é o volume gasto (mL) na retro-titulação com HCl 0,2 mol/L; Fc é o fator de concentração da solução de titulação; X é o nº de mols de NaOH gasto na titulação; Y é o nº de mols de HCl gasto na retrotitulação.

Para avaliar o Nitrogênio α -aminado (K) levou-se em consideração a quantidade de NaOH gasto na titulação (X) menos a quantidade de HCl gasto na retrotitulação (Y). O Grau de hidrólise foi então obtido pela Equação 7.

$$GH \% = \frac{K}{N_{total}} \cdot 100 \quad (7)$$

Onde, GH é o grau de hidrólise; N total é a porcentagem de Nitrogênio determinada pelo método de Kjeldahl (proteína).

2.5. Determinação da massa molecular média, comprimento da cadeia e perfil peptídico dos hidrolisados

Os hidrolisados obtidos nos diferentes tempos de hidrólise foram caracterizados em relação à massa molecular média. As amostras (1 g) foram colocadas em uma placa com matriz polimérica onde ocorreu a conversão das biomoléculas para a fase gasosa sem fragmentação. As amostras foram irradiadas com laser promovendo a ionização das moléculas que foram então aceleradas através de um campo elétrico dentro de um tubo a vácuo e individualmente analisados por analisador (TOF- tempo de voo) (CUNHA et al., 2006). Conforme o tempo de chegada os íons geraram diversos picos os quais foram expressos através da relação massa-carga (m/z) indicando quantidades variáveis de cada substância analisada.

As amostras foram analisadas em espectrofotômetro de massa do tipo MALDI-TOF (placa MALDI - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* e analisador TOF (*Time of flight*), para determinar as massas moleculares dos componentes presentes e identificar os peptídeos bioativos. Inicialmente, as amostras foram diluídas em água, em seguida dispostas em placa MALDI em volume de 1 µL de cada e misturadas a 3 µL de matriz ácido alfa-ciano 4-hidroxicinâmico em acetonitrila (70%), água (30%) e ácido trifluoroacético (0,2%). O método de operação seguiu o modo de aquisição refletor positivo (RP_pepmix), faixa de massas de 300 a 5.000 m/z. Soma de 3900 espectros acumulados de 50 em 50 por amostra. Intensidade de laser 40%. Método de operação com modo de aquisição linear positivo (LP_Clinprot), faixa de massas de 400 a 18.000 m/z. Soma de 4000 espectros acumulados de 100 em 100 amostra. Intensidade do laser utilizada foi de 30 e 40%.

Em função do espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF não estar acoplado ao detector massa (MS/MS), as respostas foram geradas em massa-carga (m/z). (Não foi possível sequenciar os peptídeos, pois o sistema não possuía banco de dados). Assumindo, que as amostras tenham sido ionizadas, conforme a calibração do equipamento em $1H^+$ (massa do hidrogênio), os valores obtidos no MALDI-TOF em m/z foram equiparados aos valores em Da.

Para avaliação da massa molecular média do peptídeo utilizou-se o cálculo empírico proposto por Perea et al. (1993), onde o comprimento médio da cadeia foi calculado de acordo com as Equações 8 e 9:

$$CMC = \frac{100}{GH} \quad (8)$$

Onde, o CMC é o Comprimento médio da cadeia; 100 é o comprimento médio da cadeia de um aminoácido e o GH é o percentual de grau de hidrólise (ADLER-NISSEN, 1986).

$$MM = (120Da)(CMC) \quad (9)$$

Onde, o MM é a massa molecular média; 120 Da é a massa molecular média de um aminoácido (MYERS et al., 1974).

2.6 Análise estatística

As determinações analíticas foram realizadas em triplicata e os resultados foram tratados estatisticamente mediante análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de *Student* e *Tukey*, com auxílio do software *Statistica* versão 5.0, ao nível de significância de 95 % de confiança.

3 Resultados e discussões

A Tabela 2 apresenta os valores de proteína total, solúvel e estabilidade das emulsões. Os teores de proteína total e solúvel são maiores na DF, pois este processo proporciona maior concentração das proteínas devido as sucessivas lavagens promovidas.

Tabela 2 - Valores de proteína total, proteína solúvel, K_1 e K_2 para o CPSLO e CPSLOD.

Amostra	Proteína Total (%) ¹	Proteína Solúvel (%) ¹	K_1	K_2
CPSLO	41 ^b	42 ^b	$3,3 \cdot 10^{-4a} \pm 0,2$	$3,2 \cdot 10^{-3a} \pm 0,3$
CPSLOD	84 ^a	47 ^a	$3,2 \cdot 10^{-8b} \pm 0,7$	$2,0 \cdot 10^{-3b} \pm 0,1$

Média $\pm$ desvio padrão seguido de letras iguais/colunas indicam não haver diferença significativa a nível de 5% (t student); ¹Expressos em base seca.

As constantes K_1 e K_2 correspondem ao tamanho das gotas geradas, onde K_2 está relacionado às gotas grandes e K_1 às gotas pequenas. Como estas constantes representam a desestabilização da emulsão, quanto maiores as gotas, mais instável será a emulsão. Portanto, o CPSLOD apresentou emulsão mais estável. As gotas pequenas representadas por K_1 são as que formam creme mais lentamente com o tempo, assim o CPSLOD pode apresentar a formação de creme mais rápido, ou seja, mais estável.

Portanto, as emulsões preparadas com soro diafiltrado são mais estáveis em relação à desestabilização do creme. De acordo com McClements (2005), o tamanho das gotas produzidas durante a formação das emulsões dependem de dois processos: a geração de gotas de pequeno tamanho e a rápida estabilização destas gotas, o que evita a sua coalescência.

Na Tabela 3 é apresentada a matriz do planejamento fatorial 2² (valores reais e codificados) do efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática da protease corolase H-pH (1% baseada no conteúdo proteico do CPSLOD), em diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h).

As pequenas oscilações observadas na Tabela 3, podem sugerir estabilidade da enzima corolase H-pH com o tempo, frente às faixas de pH e temperatura estudadas. A atividade enzimática foi maior em 1 h, para todos os experimentos, com exceção do ponto central. Assim, tempos maiores de incubação não se justificam para aumentar a atividade enzimática.

Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial 2² e resposta em termos de atividade enzimática (U/mL) em função do tempo de incubação.

Ensaio	Variáveis independentes*		Atividade Enzimática (U/mL)					
			Tempo de incubação (h)					
	X ₁	X ₂	1	2	3	4	5	6
1	40 (-1)	6 (-1)	26,79 ^a $\pm 0,10$	26,28 ^b $\pm 0,20$	25,25 ^d $\pm 0,00$	25,64 ^c $\pm 0,10$	24,48 ^e $\pm 0,10$	23,33 ^f $\pm 0,10$
2	60 (1)	6 (-1)	25,89 ^a $\pm 0,10$	24,87 ^b $\pm 0,10$	24,10 ^c $\pm 0,20$	21,92 ^e $\pm 0,10$	23,97 ^d $\pm 0,00$	20,51 ^f $\pm 0,10$
3	40 (-1)	8 (1)	26,92 ^a $\pm 0,10$	26,28 ^b $\pm 0,20$	25,77 ^c $\pm 0,12$	25,64 ^c $\pm 0,10$	25,51 ^d $\pm 0,11$	23,71 ^e $\pm 0,10$
4	60 (1)	8 (1)	29,10 ^a $\pm 0,10$	26,92 ^b $\pm 0,11$	26,66 ^b $\pm 0,20$	27,05 ^b $\pm 0,20$	26,02 ^c $\pm 0,21$	25,38 ^d $\pm 0,10$
5	50 (0)	7 (0)	25,51 ^a $\pm 0,13$	25,64 ^a $\pm 0,12$	25,87 ^a $\pm 0,12$	24,74 ^b $\pm 0,11$	24,61 ^b $\pm 0,10$	24,61 ^b $\pm 0,12$

*Média $\pm$ desvio padrão; letras diferentes em uma mesma linha correspondem a diferença estatística ao nível de 5% (Teste de Tukey). X₁= Temperatura (°C); X₂= pH; Variáveis independentes fixas: corolase H-pH (1% baseada no conteúdo proteico do CPSLOD). O ensaio 5 é a média da triplicata do ponto central.

Desta forma, os resultados da atividade enzimática em 1h, foram analisados estatisticamente. A Figura 1 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial 2^2 . Observa-se que a atividade enzimática foi influenciada significativamente ($p < 0,05$) pelo pH, temperatura e a interação entre as duas variáveis. O modelo não foi validado pela análise de variância (ANOVA), onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,92 e o F calculado de 0,2 vezes menor que o valor tabelado.

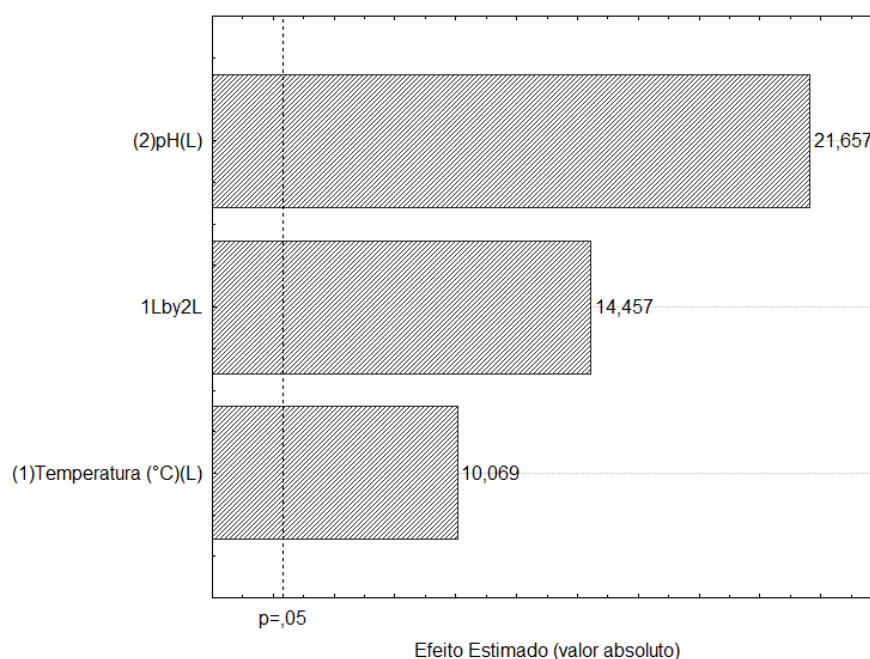


Figura 1. Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para a atividade enzimática da corolase H-pH em 1 h de incubação obtidos do planejamento fatorial 2^2 .

Em virtude de todas as variáveis avaliadas apresentarem efeito significativo positivo, foi escolhido o pH 8 e a temperatura de 60°C para a realização de experimentos de hidrólise com CPSLOD ao longo do tempo de 6 h.

A Figura 2 apresenta o grau de hidrólise do CPSLOD (solução 10% p/v) pela protease corolase H-pH (1% baseado no conteúdo proteico) em diferentes tempos de hidrólise (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h). Observa-se um aumento gradativo no grau de hidrólise até 5 h de reação, apresentando diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tempos. Após 5 h de reação não apresentou diferença estatística ($p < 0,05$), sendo este o tempo de reação, o de maior grau de hidrólise.

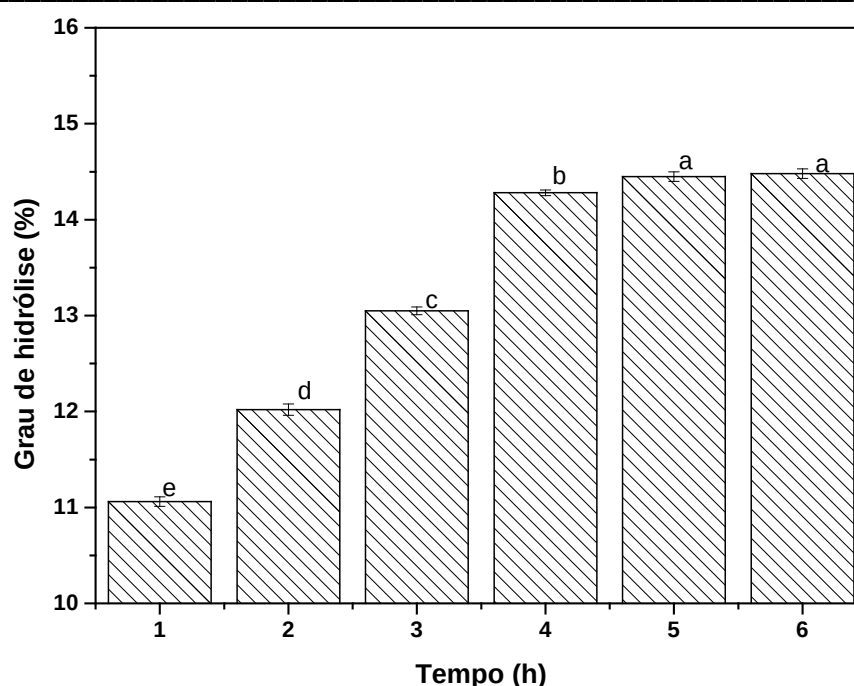


Figura 2. Grau de hidrólise da protease (corolase H-pH) em diferentes tempos.

*Média $\pm$ desvio padrão seguido de letras minúsculas iguais indicam não haver diferença estatística ao nível de 5% de significância (Teste de Tukey).

Os valores de grau de hidrólise permaneceram entre 11,06 e 14,51%, sendo similares aos encontrados para Adjonu et al. (2013) para isolados proteicos de soro de leite bovino (solução 5% p/v) utilizando-se pepsina, tripsina e quimotripsina em tempos de 12 e 24 h de hidrólise, oscilando entre 11 e 14%. Enzimas submetidas a tempos maiores de hidrólise, por exemplo de 24 h, apresentam graus de hidrólise baixos como apresentado por Adjonu et al. (2013), devido à natureza globular das proteínas do soro de leite que podem limitar a atuação da enzima. O grau de hidrólise encontrado por Pacheco et al. (2005) em 6 h de reação, foi de aproximadamente 20% para os hidrolisados de pancreatinina, protamex e alcalase a partir de concentrado proteico de soro de leite bovino (solução 10% p/v) contendo após DF; 82,72 e 6,64% de proteína e lactose, respectivamente. Para Adjonu et al. (2013), o grau de hidrólise depende da enzima, já que cada uma possui sua especificidade.

A partir dos valores de grau de hidrólise do CPSLOD (solução 10% p/v) pela protease, corolase H-pH (1% baseado no conteúdo proteico) em diferentes tempos de hidrólise (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h), foram calculados empiricamente a massa molecular média e o comprimento médio da cadeia (Tabela 4).

Tabela 4 - Massa molecular média e comprimento médio da cadeia peptídica das amostras em diferentes tempos de hidrólise.

Tempos de hidrólise (h)	Massa média da molécula (Da)	Comprimento médio da cadeia (número de resíduos de aminoácidos)
1	994	8,29
2	921	7,67
3	853	7,11
4	791	6,59
5	772	6,43
6	772	6,43

Observa-se que a massa média da molécula e o comprimento médio da cadeia diminuíram com decorrer do tempo de hidrólise, estabilizando-se em 5 h com média de 6 resíduos de aminoácidos e massa molecular média de 772 Da.

Os resultados indicam que a protease, corolase H-pH foi capaz de produzir um hidrolisado a partir da solução 10% (p/v) do CPSLOD com 1 h de reação em concentração de 1% baseado no conteúdo proteico. Em tempo de hidrólise de 5 h, a reação tornou-se constante, o que poderia indicar que a enzima, frente ao substrato, tenha atingido a sua capacidade hidrolítica máxima. Por estas razões, foram determinadas as massas-carga (m/z) dos tempos de hidrólise de 1 e 5 h em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF. Assumindo que as amostras tenham sido ionizadas conforme a calibração do equipamento em $1H^+$ (massa do hidrogênio), os valores obtidos no MALDI-TOF em m/z foram equiparados aos valores em Da.

A Figura 3 apresenta os dados de percentagem de peptídeos no intervalo de 300-20.000 m/z para 1 e 5 h de hidrólise.

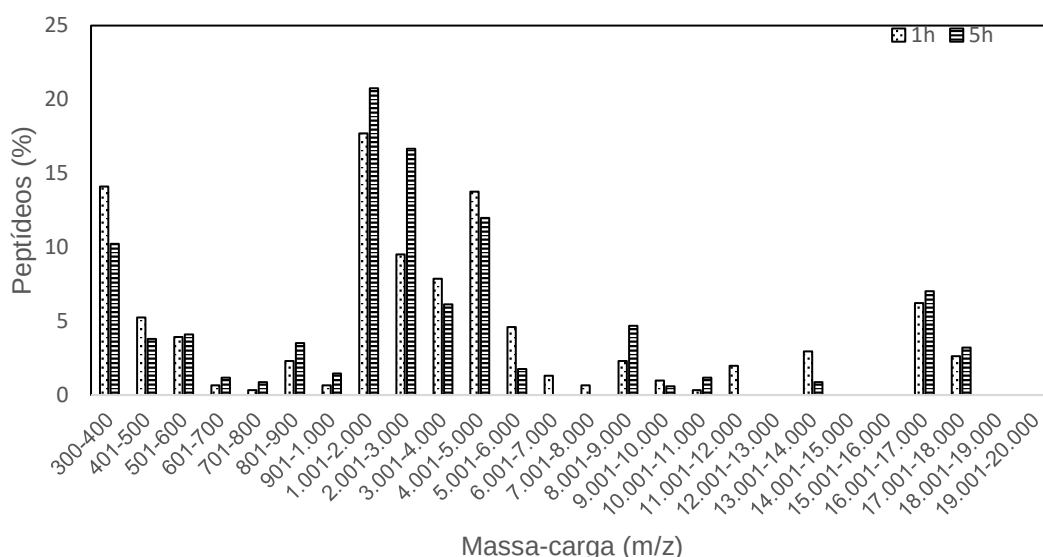


Figura 3. Percentagem peptídeos no intervalo de 300-20.000 m/z para 1 e 5 h de hidrólise.

A partir dos espectros gerados por meio do MALDI-TOF, foram detectados 305 peptídeos com m/z distintas para a amostra de 1h de hidrólise. Em 5 h de hidrólise observou-se um aumento de 12,13% no número de peptídeos comparado ao tempo de 1 h, alcançando 342 peptídeos. Esse incremento em relação ao tempo de 1 h, pode estar relacionado ao aumento no grau de hidrólise de 12,07% para 15,55% em 5 h de reação. Intervalos <300 m/z, não foram computados, pois a matriz utilizada na análise cristaliza junto com as amostras causando sobreposições no espectro. Para Silva et al. (2009), os hidrolisados a partir de concentrado proteico de soro de leite bovino (Solução 10% p/v), apresentaram (r) fraca (correlação de Pearson) entre grau de hidrólise e o perfil peptídico.

Foram constatados nos hidrolisados principalmente picos compreendidos entre 1.001-2.000 m/z (Figura 3), percentuais de 17,70% em 1 h e percentuais de 20,76% em 5 h. Outros picos em destaque corresponderam aos peptídeos entre 300-400 m/z (14,10%) e 4.001-5000 m/z (13,77%) em 1 h de hidrólise e 2001-3000 m/z (16,67%) e 4001-5000 m/z (11,99%) em 5 h de hidrólise. Corrêa et al. (2014), constataram que o permeado oriundo do hidrolisado (3 h) de caseinato de soro de leite ovino apresentou-se com maior inibição frente as duas bactérias estudadas, o que poderia sugerir que peptídeos com massas moleculares menores poderiam ter exercido maior efeito antimicrobiano. Os autores ainda submeteram o permeado

a espectrometria de massa e identificaram o peptídeo majoritário como sendo correspondente ao fragmento de caseína α_{s1} com massa molecular de 1426 Da e íon de 714,3916 (2) (m/z). Welsh et al. (2017) associaram a atividade antioxidante de hidrolisados de soro de leite ovino utilizando-se uma protease de origem bacteriana e outra de origem fúngica aos péptidos com <15 aminoácidos.

O perfil peptídico do hidrolisado em 1h foi composto de 262 peptídeos <10.000 m/z. Enquanto, que o hidrolisado em 5h apresentou 300 peptídeos para esta mesma faixa. Observa-se que não foram constatados a presença de peptídeos em 12.000, 14.000 e 15.000 e ≥ 18.000 m/z para ambos os tempos de hidrólise avaliados, o que poderia sugerir hidrólise completa das proteínas e geração de um vasto perfil peptídico pela protease corolase H-pH.

Pintado e Malcata (2000), ao avaliarem o perfil peptídico (Cromatografia por exclusão de Tamanho) da α -La purificada hidrolisada em 2,5 h pela tripsina verificaram que, após degradação da α -La surgiram essencialmente picos de 3.000-4.000 e 2.000-3.000 Da, e para β -Lg purificada picos de 4.000-6000 Da.

Em virtude dos hidrolisados deste trabalho serem compostos por uma mistura de proteínas, não foi permitido relacionar os peptídeos originados com as respectivas proteínas inicialmente presentes.

Pintado e Malcata (2000) em 2,5 h de incubação da enzima tripsina em α -La purificada, detectaram vários peptídeos <500 Da. Já em hidrólise da β -Lg purificada, os autores detectaram peptídeos <500 Da somente em 24 h de hidrólise. Peptídeos <500 Da foram encontrados no presente estudo já na primeira hora de hidrólise. Se considerar que um aminoácido apresenta massa molar média de 120 Da (MYERS et al., 1974) e que a ionização tenha ocorrido em $1H^+$ (massa do hidrogênio), os peptídeos compreendidos entre 300-400 m/z poderiam ser classificados como tripeptídeos e tetrapeptídeos.

Considerando que na faixa de 300 a 500 m/z, em 1 h de hidrólise, os peptídeos encontrados corresponderam a 23,28%. Enquanto, que em 5 h de hidrólise o percentual foi de 18,13%, logo, em 5 h de hidrólise houve uma redução de 22,12% nos tripeptídeos, tetrapeptídeos e pentapeptídeos.

Pintado e Malcata (2000), estudaram hidrolisados de soro de leite ovino, bovino e caprino pela enzima tripsina, e verificaram que a hidrólise gerou grande número de peptídeos de 500-4.000 Da. Em 24 h de incubação Silva et al. (2009) utilizando concentrado proteico de soro de leite bovino (32,65% de proteína e 54,8% de lactose) - solução 10% (p/v) e solução 7% (p/v) hidrolisado pelas enzimas, flavourzyme e corolase PP, respectivamente, ambas em concentração de enzima:substrato (1:100), obtiveram 16,14% de dipeptídeos, 9,12% tripeptídeos e ~20% de grandes peptídeos, os quais compreendem peptídeos com mais de 7 resíduos de aminoácidos.

Os peptídeos ≥ 12.000 m/z foram reduzidos em 49,04% em tempo de hidrólise de 5 h, de 2,30% para 1,17%. Esta faixa calculada empiricamente a partir do relato de Giuliani et al (2007) sobre a faixa de aminoácidos com capacidade antimicrobiana, poderia ser atribuída a essa bioatividade encontrada em destaque em 1 h de hidrólise.

Para Frenhani e Burini (1999), o metabolismo de proteínas ocorre inicialmente a formação de oligopeptídeos (2 a 6 resíduos de aminoácidos) além de aminoácidos livres e para que estes sejam absorvidos são novamente convertidos em di- e tripeptídeos, os aminoácidos livres, os quais são menos eficientes em níveis de absorção. Quanto a digestibilidade, quanto maiores os teores de di-tripeptídeos maior é a eficiência da assimilação na nutrição (SGARBIERI, 2004). Ainda a atividade antimicrobiana pode ter relação com os péptidos em faixa próxima de 5 kDa, que foram superiores para este tempo de hidrólise avaliado.

De acordo com Minervini et al. (2003), podem ocorrer variações de concentrações de peptídeos em hidrolisados de diferentes tipos de leite. Isto pode estar associado a disparidade nas proporções de caseína, sequência de aminoácidos e conformação, que podem influenciar na atuação das enzimas durante a hidrólise e geração de peptídeos bioativos.

Os resultados do presente trabalho sugerem que o tempo de 1 h de hidrólise com CPSLOD pela enzima corolase H-pH (1% baseado no conteúdo proteico), em condições otimizadas de temperatura (60°C) e pH (8), são as melhores condições para a obtenção de peptídeos com sugestibilidade de atividade antioxidante e antimicrobiana.

Estudos nos mostram que as propriedades biológicas, estão associados não somente ao tamanho do peptídeo gerado mas também a sequência das frações aminoacídicas (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2005). O perfil desses hidrolisados dependerão dos parâmetros empregados na hidrólise, das proteínas presentes, do tipo de enzima, proporção enzima-substrato e da concentração do hidrolisado.

4 Conclusões

O grau de hidrólise promovido pela corolase H-pH (1% baseado no conteúdo proteico) em CPSLOD solução 10% (p/v), 60°C e pH 8, permaneceu entre 11,06% e 14,41% durante as 6 h de reação e foi capaz de gerar um vasto perfil peptídico. Em tempo de hidrólise de 5h, a reação tornou-se constante, o que poderia indicar que a enzima, frente ao substrato, tenha atingido a sua capacidade hidrolítica máxima.

O hidrolisado em 1h de reação em relação ao tempo de 5 h apresentou o maior número de peptídeos em intervalo de 300 a 500 m/z (23,28%), também foram encontrados maiores percentuais de peptídeos em faixa de 4.000m/z (13,77%) e 5.000 m/z (4,59%) comparado ao tempo de 5h de hidrólise que apresentou valores de 11,99% e 1,75%, respectivamente. Além disso, peptídeos ≥ 12.000 m/z foram reduzidos em 49,04% em tempo de hidrólise de 5h. Nas faixas mencionadas, o número de peptídeos foi superior em 1 h de hidrólise e poderiam estar relacionados ao destaque frente as propriedades bioativas como antimicrobiana e antioxidante.

O soro de leite ovino, apresenta grande potencial para aplicação em produtos alimentícios de interesse, através do CPSLOD hidrolisado com a enzima corolase H-pH demonstrando-se um co-produto com capacidade para geração de peptídeos bioativos.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, ao Conselho Nacional de Pesquisa Brasileiro (CNPq) e a URI Erechim pela infraestrutura.

Referências

ADJONU, R.; DORAN, G.; TORLEY, P. E.; AGBOOLA, S. Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1435-1443, 2013.

ADLER-NISSEN, J. Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. Applied Science Publishers, London. Elsevier Applied Science Publishers, 427 p. 1986.

ALMEIDA, C. C.; JUNIOR, C. A. C.; SILVA, A. C. O.; ALVARES, T. S. Proteína do soro do leite: composição e suas propriedades funcionais. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia**, v.9, n.16,1840 p., 2013.

ANTUNES, A. J. Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino. Editora Manole Ltda., São Paulo. 1 ed., p.135p, 2003.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. Maryland: AOAC, 18 ed., 2005.

ATRA, R.; VATAI, G.; BEKASSY-MOLNAR, E.; BALINT, A. Investigation of ultra-and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. **Journal of Food Engineering**, v.67, n. 3, p. 325-332, 2005.

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

CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas – O papel-chave da espectrometria de massa na era pós-genômica. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 36, p. 40-46, 2006.

DE WIT, J.N. Nutritional and functional characteristics if whey proteins in foods products. *Journal of Dairy Science*, v. 81, n. 3, p. 597-608, 1998.

DIAS, D. R.; VILELLA, D.M.; SILVESTRE, M.P.C; SCHWAN, R.F. Alkaline protease from *Bacillus* sp. Isolated from coffee bean grown on cheese whey. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, p. 2027-2034, 2008.

FRENHANI, P. B.; BURINI, R. B. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 36, n.4, p. 227-237, 1999.

GIULIANI, A.; PIRRI, G.; NICOLETTO, S. Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics. **Central European Journal of Biology**, v. 2, p. 1–33, 2007.

GOBBETTI, M.; MINERVINI, F.; RIZZELLO, C.G. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactives peptides. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2/3, p. 173-188, 2004.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B., RAMOS, M; GOMEZ-RUIZ, J.A. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. **Small Ruminant Research**. v. 101, No. 1, p. 196-204, 2011.

JEEWANTHIKIM, R. K. C.; KIM, M. H.; LEE, N. K.; YOON, Y. C. e PAIK, H.D. Peptide Analysis and the Bioactivity of Whey Protein Hydrolysates from Cheese Whey with Several Enzymes. Korean Journal for Food Science of Animal Resources. Biology Molecular Informatics Center, Konkuk University, Seoul 05029, Korea. *Anais* 37. p. 62-70, 2017.

MCCLEMENTS, D.J. Food emulsions: principles, practice, and techniques. Washington: CRC Press, 2005.

MINERVINI F.; ALGARON F.; RIZZELLI C.G.; FOX. PF.; MONNET V.; GOBBETTIM. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. American Society for Microbiology, v. 69, n. 9, p. 5297-305, 2003.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. E.; VAN BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardised food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 6, p. 1715-1718, 1985.

MYERS, D. V.; RICKS, E.; WILKINSON, M.; IACOBUCCI, G. A. Chemical and nutritional evaluation of enzymatic soybean hydrolysates. The IV International Congress of Food Science and Technology. Madrid Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos Valencia, v. 5, p. 96-102, 1974.

PACHECO, M. T. B.; DIAS, N. F. G.; BALDINI, V. L. S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 333-338, 2005.

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

PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Hydrolysis of ovine, caprine and bovine whey proteins by trypsin and pepsin. **Bioprocess Engineering**. v. 23, p. 275-282, 2000.

RAIZER, E., MOLINARI, D., REINEHR, T. O., FETSCH, V. T., AWADALLAK, J. A., DA SILVA, C., DA SILVA, E. A. Produção de ácidos graxos livres através de hidrólise enzimática do óleo de girassol em ultrassom. **Revista Tecnológica**, 63-71, 2015.

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

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

TRONCO, V. M. Manual para Inspeção da Qualidade do Leite. Santa Maria: UFSM, 5 ed. 2013.

TSAKALI, E.; PETROTOS, K.; D'ALESSANDRO, A.G.; MANTAS, C.; TRIPOLITSIOTIS, I.; GOULAS, P.; CHATZILAZAROU, A.; VAN IMPE, J. F. Exploring the Effect of Ultrafiltration/Diafiltration Processing Conditions on the Lactoferrin and Immunoglobulin G Content of Feta Whey Protein Concentrates. **Journal of Food Process Engineering**. v. 38, 4 ed., p. 363-373, 2015.

WELSH, G.; RYDER, K.; BREWSTER, J.; WALKER, C.; MROS, S.; EL-DIN, A.; BEKHIT, A.; MCCONNELL, M.; CARNE, A. Comparison of bioactive peptides prepared from sheep cheese whey using a food-grade bacterial and a fungal protease preparation. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 52, p. 1252-1259, 2017.

WHITAKER, J. R. Principles of Enzymology for the Food Sciences, 2nd ed. Marcel Dekker, New York, NY, p.63-115, 1994.