



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE HIDROLISADOS DE CASEINATO CAPRINO E
BOVINO OBTIDOS A PARTIR DE PROTEASES PRODUZIDAS POR
Acremonium sp. L1-4B E *Geomyces pannorum* S2B ISOLADOS DA ANTÁRTICA**

TALITA CAMILA EVARISTO DA SILVA NASCIMENTO

RECIFE - PE

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

TALITA CAMILA EVARISTO DA SILVA NASCIMENTO

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE HIDROLISADOS DE CASEINATO CAPRINO E
BOVINO OBTIDOS A PARTIR DE PROTEASES PRODUZIDAS POR
Acremonium sp. L1-4B E *Geomyces pannorum* S2B ISOLADOS DA ANTÁRTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Biociência Animal.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Keila Aparecida Moreira (UAG/UFRPE)

Co-orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior (FCF/USP)

RECIFE - PE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

N244a Nascimento, Talita Camila Evaristo da Silva
Atividades biológicas de hidrolisados de caseinato caprino e bovino obtidos a partir de proteases produzidas por *Acremonium* sp. L1-4B E *Geomyces pannorum* S2B isolados da Antártica / Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento. – 2017.
176 f.: il.

Orientadora: Keila Aparecida Moreira.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2017.
Inclui referências e apêndice(s).

1. Fermentação 2. Proteases 3. Hidrolisados 4. Peptídeos bioativos 5. Caseína bovina 6. Caseína caprina I. Moreira, Keila Aparecida, orient. II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

TALITA CAMILA EVARISTO DA SILVA NASCIMENTO

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE HIDROLISADOS DE CASEINATO CAPRINO E
BOVINO OBTIDOS A PARTIR DE PROTEASES PRODUZIDAS POR
Acremonium sp. L1-4B E *Geomyces pannorum* S2B ISOLADOS DA ANTÁRTICA**

Tese apresentada e aprovada pela comissão examinadora:

Prof^a. Dra. Keila Aparecida Moreira (UAG/UFRPE)
Presidente

Prof^a. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto (DMFA/UFRPE)
Membro Interno

Prof^a. Dra. Raquel Pedrosa Bezerra (DMFA/UFRPE)
Membro Interno

Prof^a. Dra. Daniela de Araújo Viana Marques (Campus Serra Talhada/UPE)
Membro Externo

Prof^a. Dra. Lidianne Roberta Cruz da Silva (PNPD-CAPES/UFRPE)
Membro Externo

Suplentes da comissão examinadora:

Prof^a. Dra. Cristina Maria de Souza-Motta (Micoteca URM/UFPE).

Prof^a. Dra. Carolina de Albuquerque Lima (Campus Garanhuns/UPE).

RECIFE - PE

2017

Dedico todas as conquistas à minha melhor amiga, maior incentivadora dos meus sonhos, meu anjo da guarda e a melhor parte de mim, **Ana Paula Evaristo da Silva** (Mainha).

Agradecimentos

À **Deus**, por proteger a mim e a todos que amo.

À **Profª Drª. Keila Aparecida Moreira**, por sua orientação, dedicação, carinho, amizade e todos os ensinamentos que tanto têm contribuído para a minha formação científica.

Ao **Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior**, por sua atenção, orientação e disponibilidade para ajudar sempre. Sendo essencial no meu desenvolvimento no âmbito acadêmico.

Às **Profª Drª. Erika Valente** e **Drª. Gisele Monteiro, Drª. Elizabete Rodrigues** pelo carinho e atenção que sempre tiveram comigo, assim como pelos sorrisos e ótimo humor mudando o tom dos dias.

Ao **Prof. Dr. Roberto Silva, Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi** e a **Profª. Drª. Lara Sette** pela contribuição científica para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao **Dr. João Vitor Molino** (Joaõzinho), por me instruir a compartilhar conhecimento como uma forma de aprender cada vez mais, por sempre me dar força para seguir adiante nos momentos de dificuldade e por tudo que você me ensinou. E um obrigada especial a sua esposa **Carol**, que cuida de você meu amigo com muita paciência e afeto.

À **Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE** por me proporcionar educação de qualidade. Sou grata à **Unidade Acadêmica de Garanhuns - UAG**, à **Universidade de São Paulo – USP** e à **Universidade Estadual Paulista – UNESP**. Bem como, ao **CENLAG/UAG** e o **LABIOTEC/USP**, por disponibilizarem suas instalações e seus equipamentos para o desenvolvimento deste trabalho.

As agências de fomento **FACEPE** IBPG-0626-5.05/12, que me concedeu a bolsa de estudos, com a qual desenvolvi esse trabalho. A **Capes**, através do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica - Novas Fronteiras **PROCAD-NF**: 0921/2010. Meu projeto também inserido no âmbito dos projetos temáticos **FAPESP** 2010/17033-0. “Exploração biotecnológica de fungos derivados da Antártica” e **FAPESP** 2013/19486-0 “Biotecnologia marinha e Antártica: enzimas microbianas e suas aplicações”.

Ao grupo **Titanium**, que ao longo destes anos de convivência sempre me ouviram, incentivaram e apoiaram. Obrigada meus queridos **Erick Galindo, Rosângela Falcão e Patrícia Lins...** Por todos os ensinamentos acadêmicos e para a vida. Amo vocês e levarei sempre comigo.

À **Priscila Santos Donado e Amanda Reges de Sena**, amigas que ganhei durante o doutorado, pesquisadoras exemplares, pelas quais eu tenho um carinho e respeito imenso.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia, Tecnologia Enzimática e Bioprodutos – LMTEB/UAG/UFRPE, especialmente à **Anna Carolina, Camila Lira, Ivaldo Almeida, Mauro Vilar, Jamilly Barros, Edson Flávio, Gilvannya Sobral, William Xavier**, minha admiração por vocês é grande, assim como é imenso o desejo de ver o sucesso de vocês. Sou grata aos queridos **Catarina Ramos, Daniele Ribeiro, Glêce Milene, Leandro Fragoso, Vinícius Cooper** pela amizade, pelos cafés, pelas risadas, adoro vocês.

À **Welington Leal**, que faz jus ao nome que tem. Amigo leal, obrigada por toda sua dedicação, tua participação foi fundamental nesta pesquisa.

Aos amigos da **Faculdade de Ciências Farmaceuticas - FCF/USP**, sempre dedicados e disponíveis a ajudar: **Juan Carlos, Ignacio Moguel, Luciana Lario, David Camacho, Joãozinho (Português), Larissa Bentim, Wilma Raianny, Giovanna Menegheth, Alex Oliveira, Valéria Carvalho, Angela Jozala e a Karin Torres**. Sou-lhes grata por todas as contribuições científicas, bem como, pelos sorrisos e cantorias.

Ao **Tales Costa (Tatá)**, à **Luciana Bueno (Lulu)** e ao **Valker Feitosa (Kercio)**, alunos também da **Faculdade de Ciências Farmaceuticas - FCF/USP**, imprescindíveis nestes anos a me apoiar, rindo até das tragédias e sendo apoio até mesmo em questões pessoais.

Às minhas migles siamesas **Rafaela Coelho e Bruna Divino**, elas que como verdadeiras irmãs que sempre cuidaram de mim, nos momentos bons e nos mais difíceis elas sempre estiveram ao meu lado. Sou grata também a **Felipe Ferreira** meu cunhado querido, sempre muito atencioso e compreensivo.

À toda minha **família**, pela admirável compreensão e apoio em todas as minhas decisões, especialmente aos meus avós **Edileuza Menezes** e **Paulo Evaristo** (*in memoriam*), que ativamente participaram da minha educação.

Aos meus padrinhos **Jucicleide Silva** e **Paulo Filho**, bem como, meus primos **Tacito Fernando**, **Tarciana Fernanda** e **Solange Evaristo** que sempre estiveram ao meu lado, nas minhas idas e vindas, por terra ou pelo ar, esperando ansiosos eles sempre estavam lá.

À minha afilhada **Ana Letícia**, ela que com graça e inteligência me ensina diariamente sobre as coisas mais importantes da vida, seu sorriso é um dos meus maiores incentivos.

Aos meus **tios** e **tias** pelo carinho e pelo cuidado, especialmente a tio **Reginaldo Menezes**, **Paulo Francisco**, **Rozilda**, **José Carlos**, a meus primos **Pedro Artur**, **Victor Hugo**, **Maria Clara**, **Alex Alam**, **Sumary Klecia**, **Nathalia Vanessa**, **Carla Vanessa**, **Gessica Caroline**, **Leandro Wagner**, **Sandro**, **Alam Gregory** e todos os outros.

À meus queridos amigos pela torcida e compreensão, meus ouvidos nesses quatro anos de trabalho, idas e vindas: **Wando Rocha**, **Julliana (JMA)**, **Rebecca Brayner**, **Egberto Filho**, **Carol Notaro**, **Manu Araujo**, **Diego (Pinguim)**, **Marquinhos**, **Julian**, **Juliana Nataly**. Bem como, à família Rocha que sempre me acolheu com tanto carinho **Erinaldo**, **Nilda**, **Eliakim**, **Efraim** e **Rita**. Aos amigos que conquistei pelo caminho que de forma tão amável me deram um lar mesmo estando longe de casa **Eneilson João**, **Sair Maximo**, **Ana Letícia**, **Ilca Suzana**, **Isaias**, **Joakim**, **Lucelia**, **Carlitos**, **Juan Carlos** e **Fabian**.

À **Graça Borba**, indispensável incentivadora, fundamental para o início desta jornada. Obrigada por sua disponibilidade e afeto, acima de tudo por acreditar em mim.

A **Chico Buarque** e a **Lenine**, por inspirarem meus dias com suas canções, dando leveza e ânimo quando os o AKTA não obedecia e os fungos não esporulavam.

Ao meu companheiro de todas as horas, incluindo durante o sono (sonâmbula várias vezes pedi pra ele desligar a centrífuga e congelar as amostras). Por me acompanhar ao vivo ou pelo skype nas noites de tese, meu personal estatístico. Sua paciência, seu afeto e determinação foram indispensáveis **Namorado**. Obrigada Dr. **Gualberto Agamez Montalvo**.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.

Simone de Beauvoir

RESUMO

Micro-organismos extremófilos oferecem uma excelente oportunidade no campo da enzimologia e bioprocessos por sua competência em produzir extremozimas. Prioritárias para biotecnologia, essas proteínas costumam apresentar peculiaridades que se acertam com as circunstâncias desfavoráveis encontradas nos processos industriais. A maquinaria adaptada destes organismos pode produzir inúmeros biocatalisadores, incluindo proteases. São enzimas que clivam ligações peptídicas das proteínas, gerando peptídeos e aminoácidos, com aplicações em diversos segmentos industriais. Caseínas são importantes proteínas do leite, sobretudo, por serem precursoras de peptídeos bioativos. Esses peptídeos são aliados na promoção de saúde como modulares de efeitos fisiológicos benéficos ao organismo. Objetivou-se produzir altas concentrações de protease extracelular mediada por inferências estatísticas através de fungos psicrófilos, purificar a enzima e aplicar na hidrólise de caseínas bovina e caprina, para prospectar peptídeos bioativos nos hidrolisados. Os fungos psicrófilos *Acremonium* sp. L1-4B e *Geomyces pannorum* S2B, isolados do continente Antártico foram empregados em distintos processos fermentativos utilizando planejamentos experimentais analisados pelo software Statistica 8.0. A protease de *Acremonium* sp. L1-4B foi empregada na hidrólise das caseínas bovina e caprina, os hidrolisados avaliados em função das atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-hipertensiva. Posteriormente, a técnica de espectrometria de massas foi realizada a fim de identificar as sequências suscitadas. A protease de *G. pannorum* S2B foi aplicada na hidrólise do caseinato bovino, avaliada a influência da temperatura no grau de hidrólise e na formação de peptídeos antioxidantes. Ambas as proteases produzidas no estudo exibiram aptidão na clivagem das caseínas, e todos os hidrolisados apresentaram resultados promissores nos testes antioxidantes. No entanto, hidrolisados obtidos com ação da protease de *Acremonium* sp. L1-4B apresentaram também atividade antimicrobiana e anti-hipertensiva. No hidrolisado caprino as análises MS/MS identificaram 31 sequências peptídicas, no bovino 23 e alguns destes peptídeos apresentaram atividade biológica. A proteólise proposta é eficiente na produção de hidrolisados derivados das caseínas bovina e caprina com atividades biológicas comprovadas, quando avaliada sua segurança poderão ser incorporados a alimentos funcionais para prevenir doenças, na conservação de alimentos ou até mesmo no desenvolvimento de fármacos.

Palavras-chave: Fermentação; Proteases; Hidrolisados, Peptídeos bioativos; Caseína bovina; Caseína caprina.

ABSTRACT

Extremophilic microorganisms offers an excellent opportunity in the field of enzymology and bioprocesses for their capability in producing extremozymes. Priority for biotechnology, these proteins usually present peculiarities that fit the unfavorable circumstances found in the industrial processes. Its tailored machinery can produce numerous biocatalysts, including proteases. Are enzymes that cleave peptide bonds of proteins, generating peptides and amino acids, with applications aimed at several industrial segments. Caseins are important milk proteins, especially because they are precursors of bioactive peptides. These peptides are allies in promoting health as modulating beneficial physiological effects to the body. The objective of this study was to produce high concentrations of extracellular protease mediated by statistical inferences through psychrophilic fungi, to purify the enzyme and afterwards apply in the hydrolysis of bovine and caprine caseins, in order to extract from the hydrolysates prospective bioactive peptides. The psychrophilic fungi *Acremonium* sp. L1-4B and *Geomyces pannorum* S2B, isolated from the Antarctic continent were used in different fermentation processes using experimental design analyzed by Statistica 8.0 software. The protease of *Acremonium* sp. L1-4B was used in the hydrolysis of the bovine and caprine caseins, the hydrolysates were evaluated as a function of the antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. Hereafter, the mass spectrometry technique was performed to identify the sequences raised. The protease from *G. pannorum* S2B was applied in the hydrolysis of bovine caseinate, the influence of temperature on the degree of hydrolysis and formation of antioxidant peptides was evaluated. Both proteases produced in the study showed ability in cleavage of the caseins, and all hydrolysates showed promising results in the antioxidant tests. However, hydrolysates obtained through the protease of *Acremonium* sp. L1-4B also displayed antimicrobial activity and antihypertensive. In the goat and bovine hydrolysate the MS/MS analyzes identify respectively 31 and 23 peptides, some with biological activity. The proposed proteolysis is efficient in the production of hydrolysates derived from bovine and caprine caseins with proven biological activities, when evaluated their safety can be incorporated into functional foods to prevent disease, food preservation or even drug development.

Keywords: Fermentation; Proteases; Hydrolysate, Bioactive peptides; Bovine casein; Caprine casein.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	alfa
BCA	ácido bicinconínico
BSA	albumina do soro bovino
ANOVA	análise de variância
β	beta
κ	capa
g L^{-1}	grama por litro
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
TCA	ácido tricloroacético
kDa	quiloDaltons
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitros
μL	microlitros
nm	nanômetros
PMSE	fluoreto de fenilmetanosulfonil
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
U	unidades de enzima
Da	Daltons

LISTA DE ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Código (três letras)	Código (uma letra)
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Aspargina	Asn	N
Cisteína	Cis	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Ambientes marinho e terrestre antártico (2015).....	22
Figura 2. Ilustração de pesquisador coletando amostras de solo para prospecção de micro-organismos na Antártica.....	23
Figura 3. Classificação das proteases de acordo com locais de clivagem da enzima, o símbolo (○) representa os resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica; enquanto, o (●) simboliza os resíduos de aminoácidos liberados depois da proteólise.....	25
Figura 4. Formas de obtenção de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de proteínas alimentares.....	31
Figura 5. Seção transversal do modelo de uma micela de caseína proposto por Walstra (1999).....	34
Figura 6. Funcionalidade de peptídeos bioativos provenientes de proteínas do leite e seus potenciais alvos de atuação.....	36

CAPÍTULO I

Figura 1. Superfície de resposta e curvas de contorno para a produção de protease por <i>Acremonium</i> sp. L1-4B, interação de temperatura e pH (A), em função da temperatura e concentração de extrato de levedura (B), e do extrato de levedura e pH (C).....	84
Figura 2. Efeitos da temperatura (A) e do pH (B) sobre a atividade e a estabilidade aos 180 minutos da protease produzida por <i>Acremonium</i> sp. L1-4B....	85
Figura 3. Efeito da concentração de NaCl na atividade catalítica de proteases produzidas por <i>Acremonium</i> sp. L1-4B.....	86
Figura 4. Eletroforese SDS-PAGE e zimograma da protease secretada por <i>Acremonium</i> sp. L1-4B. Coluna 1: marcador padrão de massa molecular (14,4 kDa - α -lactalbumina; 20,1 kDa - inibidor de tripsina; 30,0 kDa - anidrase carbônica; 45,0 kDa - ovalbumina; 66,0 kDa - albumina de soro bovino; 97,0 kDa - fosforilase B); Coluna 2: extrato enzimático bruto; Coluna 3: zimografia.....	87

CAPÍTULO II

Figura 1. Avaliação da atividade antioxidante dos hidrolisados de caseinato caprino e bovino obtidos através da protease de *Acremonium* sp. L1-4B; testes de sequestro do radical ABTS^{•+} (a), DPPH[•] (b), habilidade de quelação dos íons metálicos cobre (c) e ferro (d)..... 121

CAPÍTULO III

Figura 1. Gráfico de Pareto contendo os efeitos das variáveis testadas no planejamento Plackett-Burman, tendo como variável resposta a atividade proteásica (U mL⁻¹) do *G. pannorum* S2B..... 150

Figura 2. Superfície de resposta e curvas de contorno para a produção de protease por *G. pannorum* S2B, interação de MgSO₄ e (NH₄)₂SO₄ (a), da glicose e (NH₄)₂SO₄ (b), do MgSO₄ e glicose (c), ureia e (NH₄)₂SO₄ (d), ureia e MgSO₄ (e), ureia e glicose (f)..... 151

Figura 3. Perfil eletroforético tricina-SDS-PAGE dos hidrolisados de caseína bovina obtidos por ação da protease de *G. pannorum* S2B, onde Padrão corresponde ao padrão de massa molecular, CB ao caseinato bovino não hidrolisado e nas demais colunas os hidrolisados em função da temperatura (°C)..... 152

Figura 4. Capacidade dos hidrolisados bovino obtidos a partir da protease de *Geomyces pannorum* S2B sequestrar os radicais ABTS^{•+} e DPPH[•]..... 153

Figura 5. Capacidade dos hidrolisados bovino obtidos a partir da protease de *Geomyces pannorum* S2B de quelar metais de transição cobre e ferro..... 154

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Principais grupos de micro-organismos extremófilos e seus ambientes, adaptada de Dalmaso et al. (2015).....	19
--	----

Tabela 2. Enzimas provenientes de micro-organismos de ambientes frios e algumas de suas características.....	24
---	----

CAPÍTULO I

Tabela 1. Valores reais e codificados para a otimização da produção de proteases por <i>Acremonium</i> sp. L1-4B, usando o Delineamento Composto Central.....	76
--	----

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial 2^3 com três pontos centrais, contendo dados experimentais da atividade total da protease produzida por <i>Acremonium</i> sp. L1-4B.....	77
---	----

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) para produção de proteases por <i>Acremonium</i> sp. L1-4B de acordo com o planejamento fatorial 2^3 com três pontos centrais.....	78
--	----

Tabela 4. Estimativa dos efeitos das variáveis na produção de protease por <i>Acremonium</i> sp. L1-4B de acordo com o planejamento fatorial 2^3 com três pontos centrais.....	79
---	----

Tabela 5. Matriz do planejamento DCC, contendo atividade proteásica como variável resposta e dados previstos no modelo.....	80
--	----

Tabela 6. Estimativa dos efeitos das variáveis na produção protease por <i>Acremonium</i> sp. L1-4B conforme o planejamento DCC.....	81
---	----

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) dos dados apresentados na Tabela 5.....	82
---	----

Tabela 8. Efeito de surfactantes, agente branqueador, desnaturante químico e inibidores na atividade proteásica.....	83
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Grau de hidrólise dos caseinatos caprino e bovino em função do tempo e atividade inibitória de ECA dos hidrolisados obtidos a partir da protease de	
--	--

<i>Acremonium</i> sp. L1-4B.....	115
----------------------------------	-----

Tabela 2. Atividade antimicrobiana dos hidrolisados de caseinato caprino e bovino obtidos a partir da protease de <i>Acremonium</i> sp. L1-4B, contra bactérias Gram-negativas e Gram-positiva, onde, os símbolos (+) indicam a presença e (-) ausência da inibição do crescimento microbiano.....	116
---	-----

Tabela 3. Peptídeos identificados por espectrometria de massas (MS/MS) na fração <10 kDa proveniente da hidrólise de caseína bovina por protease de <i>Acremonium</i> sp. L1-4B (tempo 8 h).....	117
---	-----

Tabela 4. Peptídeos identificados por espectrometria de massas (MS/MS) na fração <10 kDa proveniente da hidrólise de caseína caprina por protease de <i>Acremonium</i> sp. L1-4B (tempo 8 h).....	119
--	-----

CAPÍTULO III

Tabela 1. Valores reais e codificados para a seleção de variáveis na produção de proteases por <i>Geomyces pannorum</i> S2B, usando o delineamento Plackett-Burman.	144
--	-----

Tabela 2. Valores reais e codificados empregados no Delineamento Composto Central para otimização da produção de proteases por <i>G. pannorum</i> S2B.....	145
---	-----

Tabela 3. Matriz do delineamento de Plackett-Burman contendo os valores codificados, os dados experimentais e preditos para o modelo na produção de proteases por <i>G. pannorum</i> S2B.....	146
--	-----

Tabela 4. Análise de variância para os dados obtidos no planejamento de Plackett-Burman na produção de proteases por <i>Geomyces pannorum</i> S2B isolado no continente Antártico.....	147
---	-----

Tabela 5. Análise de variância para os dados obtidos no Delineamento Composto Central para produção de proteases por <i>Geomyces pannorum</i> S2B isolado no continente Antártico.....	148
---	-----

Tabela 6. Estimativa dos efeitos das variáveis na produção protease por <i>G. pannorum</i> S2B conforme o planejamento Delineamento Composto Central.....	149
--	-----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Micro-organismos extremófilos	19
3.2 Micro-organismos psicrófilos	20
3.3 Micro-organismos provenientes do continente Antártico	21
3.4 Proteases	24
3.4.1 Produção de proteases microbianas através de planejamentos experimentais	26
3.4.2 Palma forrageira como substrato no processo fermentativo	27
3.4.3 Aplicação de proteases	29
3.5. Hidrolisados proteicos	30
3.6 Caseína	32
3.7 Peptídeos bioativos	34
3.8 Peptídeos bioativos derivados de proteína do leite	35
3.9 Peptídeos antioxidantes	38
3.10 Peptídeos antimicrobianos	39
3.11 Peptídeos inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina	41
4. REFERÊNCIAS	43
CAPÍTULO I	51
Serino protease extracelular por <i>Acremonium</i> sp. L1-4B isolado na Antártica: Superprodução utilizando extrato de palma com metodologia de superfície de resposta---	51
CAPÍTULO II	88
Prospecção de peptídeos bioativos em hidrolisados de caseinato caprino e bovino: Avaliação in vitro das atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-hipertensiva -----	88

CAPÍTULO III	122
Atividade antioxidante de hidrolisados de caseinato bovino obtidos a partir da protease produzida por <i>Geomyces pannorum</i> S2B	122
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	155
APÊNDICES	156
Apêndice I. Nomenclatura, identificação taxonômica e origem dos isolados de fungos filamentosos do continente Antártico utilizados neste trabalho de tese.	156
Apêndice II. Fungos proteolíticos isolados de amostras da Antártica e empregados no estudo.	156
Apêndice III. Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos substratos empregados nas fermentações da tese (capítulo I e III).	157
Apêndice IV. Fungo filamentoso <i>Acremonium</i> sp. L1-4B isolado de amostra de líquen Antártica utilizado no capítulo I.	157
Apêndice V. Meio de cultivo a base de extrato de palma antes e depois da fermentação por <i>Acremonium</i> sp. L1-4B (capítulo I).	158
Apêndice VI. Capítulo I publicado na revista Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.	158
Apêndice VII. Tabela de purificação da protease de <i>Acremonium</i> sp. L1-4B, utilizando ultrafiltração e a coluna de exclusão molecular (Superdex 75 10/300) acoplada ao sistema FPLC (capítulo II).	159
Apêndice VIII. Estratégias de purificação utilizadas no estudo (capítulo II e III).	160
Apêndice IX. Perfil eletroforético (tricina-SDS-PAGE) dos hidrolisados de caseína caprina obtidos através da protease de <i>Acremonium</i> sp. L1-4B (1º gel - separação 15%, 2 e 3º gel - separação 16% com ureia 6M).	161
Apêndice X. Perfil eletroforético (tricina-SDS-PAGE) dos hidrolisados de caseína bovina obtidos através da protease de <i>Acremonium</i> sp. L1-4B (1º gel - separação 15%, 2 e 3º gel - separação 16% com ureia 6M).	162
Apêndice XI. Dados da espectrometria de massas (MS/MS) realizada para os hidrolisados bovino e caprino (tempo 8 h), resultados apresentados no capítulo II.	163
Apêndice XII. Espectro de massa do hidrolisado bovino (tempo 8 h), seus resultados foram apresentados no capítulo II.	164
Apêndice XIII. Espectro de massa do hidrolisado caprino (tempo 8 h), seus resultados foram apresentados no capítulo II.	164
Apêndice XIV. Identificação por MS/MS das proteínas expressas.	165

Apêndice XV. Fungo <i>Geomyces pannorum</i> S2B empregado na produção de proteases apresentada no capítulo III. -----	166
Apêndice XVI. Perfil eletroforetico (tricina-SDS-PAGE) dos hidrolisados de caseína bovina obtidos através da protease de <i>G. pannorum</i> S2B no capítulo III (gel de separação 16% com ureia 6M). -----	166
Apêndice XVII. Trabalhos relacionados a pesquisa apresentados em congressos e simpósios. -----	167

1. INTRODUÇÃO

Extremófilos são organismos que colonizam lugares hostis, se propagam em condições geoquímicas extremas como fontes hidrotermais, ambientes salinos, dentro de rochas e até mesmo no gelo. Modificações genéticas durante o processo evolutivo permitiram a sobrevivência e consequentemente o endemismo destes seres vivos, conferindo-lhes peculiaridades que atraem estudos de bioprospecção através da metagenômica (DALMASO et al., 2015).

Inseridos no amplo grupo dos extremófilos estão os psicrófilos, micro-organismos competentes a viver no frio, para isso, eles desenvolveram uma maquinaria biológica especializada que permite sintetizar catalisadores adequados para atuar nas temperaturas congelantes do seu habitat, além do que, tiveram suas membranas celulares adaptadas, dessa forma eles conseguem manter seu metabolismo ativo e sua capacidade reprodutiva (CAVICCHIOLI et al., 2011; MARGESIN; MITEVA, 2011).

Extremozimas são proteínas produzidas por organismos oriundos de ecossistemas que oferecem condições ambientais severas, um exemplo destes habitats são as regiões polares, que comumente também apresentam outras características desfavoráveis como altos índices de radiação ultravioleta e de salinidade (BURG, 2003; SINGH et al., 2011). As adequações extraordinárias destes biocatalisadores garante sua aplicabilidade, sobretudo, por apresentar tolerância diante dos fatores físico-químicos invasivos dos processos industriais, sobretudo na formulação de biocombustíveis, na síntese farmacêutica e na geração de produtos alimentícios (DALMASO et al., 2015).

Proteínas adaptadas ao frio possuem uma conformação distinta que promove atividade catalítica elevada mesmo em baixas temperaturas, entretanto, é comum que apresentem labilidade ao calor. Característica útil nos processos biotecnológicos com misturas enzimáticas complexas, onde estas proteínas podem ser seletivamente inativadas quando necessário. Apresentando benefícios que vão desde economia de energia para aquecer os reatores industriais, até mesmo limpeza no processamento pois, em temperaturas elevadas um grande número de reações químicas indesejáveis podem ocorrer, originando contaminantes (CAVICCHIOLI et al., 2002; VÁZQUEZ et al., 2008; CAVICCHIOLI et al., 2011).

Classificadas como um subgrupo das hidrolases, proteases são enzimas que atuam na clivagem das ligações peptídicas das proteínas, podem ser classificadas como exopeptidases e endopeptidases de acordo com a posição de clivagem da cadeia polipeptídica. Distribuídas de modo ubíquo na natureza, desempenham papéis fundamentais na fisiologia de animais,

plantas e micro-organismos (RAO et al., 1998; TREMACOLDI, 2009). Estudos que realizam a prospecção e identificação de novas proteases se tornaram fundamentais para o crescente mercado de aplicação destas enzimas. De modo geral, a proteólise é um instrumento de modificação funcional de proteínas que exerce um papel importante no processamento biotecnológico de alimentos, atuante nos processos de emulsificação, solubilização, diminuição alergênica, melhoria sensorial e até mesmo na liberação de peptídeos com propriedades bioativas (TAVANO, 2013).

Resíduos agroindustriais são comumente utilizados em bioprocessos com intuito gerar catalisadores, inclusive proteases, para isto o uso de planejamentos experimentais é extremamente necessário. A inovação de combinar materiais biológicos advindo de distintos biomas, auxiliado por ferramentas estatísticas viabiliza o processo fermentativo reduzindo os custos que giram em torno da produção de enzimas. Distintas formas de biotransformação a partir de processos fermentativos têm sido exploradas, com o intuito de prospectar biocatalisadores aptos a atuar na manufatura de produtos lácteos, beneficiando um setor de destaque na região Nordeste do Brasil.

Proteases oriundas de plantas e micro-organismos são empregadas com sucesso na hidrólise de proteínas derivadas do leite. Na obtenção destes hidrolisados também podem ser utilizadas cepas proteolíticas inoculadas na fermentação, ou até mesmo a combinação simultânea de ambos os métodos, com o objetivo de alcançar maiores rendimentos e diversificar o produto (KORHONEN, 2009; HAFEEZ et al., 2014).

Na indústria de laticínios um dos componentes mais requisitados do leite são as proteínas, responsável por diversos atributos nutricionais e de textura (KRUIF et al., 2012). Segundo Korhonen e Pihlanto (2006), as estruturas das proteínas do leite bovino e humano estão entre as mais bem elucidadas, existem investigações no mundo inteiro a respeito delas e de suas possíveis bioatividades, inclusive, já existem dados que revelam suas atividades regulatórias específicas em animais.

As caseínas são as proteínas encontradas em maior concentração no leite, fosfoproteínas que apresentam insolubilidade em pH 4,6, característica bem explorada na indústria, onde a metodologia de precipitação isoelétrica é utilizada com frequência para obtenção de caseinatos e caseína (FOX, 2009; KRUIF et al., 2012). São moléculas anfipáticas, seus resíduos hidrofóbicos, polares, estão distribuídos de forma desigual em sua estrutura, apresentando assim áreas hidrofóbicas e hidrofílicas (FOX, 2001).

Diversos estudos têm empregado caseína como fonte de compostos bioativos. De acordo com Park et al. (2009), em hidrolisados de proteína de leite bovino já foram identificados peptídeos opióides, antimicrobianos e antioxidantes. Zhang et al. (2016), afirmam que estudos sobre peptídeos bioativos cujas proteínas precursoras advêm do leite caprino são menos corriqueiros do que o bovino. Neste contexto, Park et al. (2007), asseguram que proteínas provenientes do leite de cabras e ovelhas são fontes promissoras de peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina e de agentes antimicrobianos.

Compostos bioativos provenientes do leite representam para indústria de laticínios uma oportunidade de expansão no âmbito do bioprocessamento, através do desenvolvimento de alimentos com propriedades nutraceuticas, que podem atuar diminuindo o risco de desenvolver doenças crônicas, além de agir no sistema imunológico do indivíduo (KORHONEN; PIHLANTO, 2006).

Estudos de proteólise de proteínas lácteas têm-se intensificado nos últimos anos, devido à importância funcional das sequências precursoras destas proteínas. As clivagens específicas na cadeia polipeptídica das caseínas permitem a liberação de peptídeos com bioatividade que podem ser úteis na promoção da saúde. De modo que, esses hidrolisados podem ser avaliados *in vivo* ou *in vitro*, quanto aos seus benefícios fisiológicos.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Avaliar *in vitro* o potencial antimicrobiano e antioxidante dos peptídeos provenientes da hidrólise das caseínas caprina e bovina por proteases produzidas por fungos filamentosos isolados da Antártica.

2.2 *Objetivos específicos*

- Estabelecer parâmetros para produção de proteases através de um fungo filamentoso isolado na Antártica, empregando modelos experimentais para viabilizar o uso da palma forrageira como substrato majoritário no processo fermentativo, e consequentemente, detectar as características bioquímicas da enzima obtida no estudo.
- Avaliar *in vitro* as atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-hipertensiva das frações de baixa massa molecular dos hidrolisados de caseinato caprino e bovino obtidos através da protease secretada por *Acremonium* sp. L1-4B, e identificar os peptídeos presentes nos hidrolisados.
- Aumentar a produção de proteases por fermentação submersa a partir de *Geomyces pannorum* S2B de origem marinha isolado da Antártica, purificar parcialmente a enzima e empregar na hidrólise de caseína bovina para obter hidrolisados com potencial antioxidante.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Micro-organismos extremófilos*

Comunidades microbianas podem ser encontradas em habitat aparentemente inóspitos, onde grande parte dos seres vivos jamais conseguiria sobreviver, estes são denominados micro-organismos extremófilos. No processo evolutivo, alguns organismos desenvolveram adaptações que possibilitaram sua permanência em lugares que apresentam temperaturas extremamente baixas ou elevadas, bem como em diferentes níveis de pressão, alto teor de salinidade e pH (BURG, 2003; TORTORA et al., 2010).

Existem outros grupos de extremófilos menos conhecidos, como é o caso dos metalófilos, aptos a crescer em concentrações elevadas de metais pesados; na eminência de radiação, os radiófilos; dentro de rochas, os endolíticos e até mesmo em privação de oxigênio, como é o caso dos microaerófilos (TORTORA et al., 2010; DALMASO et al., 2015). Na Tabela 1 estão apresentados os principais grupos de extremófilos e suas condições de desenvolvimento.

Tabela 1. Principais grupos de micro-organismos extremófilos e seus ambientes, adaptada de Dalmaso et al. (2015).

Grupos de micro-organismos extremófilos	Parâmetros ambientais de crescimento
Acidófilo	Abaixo do pH 3,0.
Alcalófilo	Acima do pH 10,0.
Halófilo	Altas concentrações de NaCl.
Hipertermófilo	Acima de 80 °C.
Termófilo	Entre 60 e 85 °C.
Psicrotolerante	Entre 15 e 25 °C.
Psicrófilo	Entre 10 e 20 °C.
Barófilos	Altas pressões, mais que 400 atm.
Endolíticos	Dentro de rochas.
Oligotrófico	Escassez de nutrientes.
Radiófilo	Altos níveis de radiação.
Metalófilo	Altas concentrações de metais pesados.
Tóxico-resistente	Altas concentrações de agentes tóxicos.
Xerófilo	Pouca água.

Espécies extremófilas também são fontes de metabólitos com características diferenciadas resultantes das modificações estruturais relacionadas à adaptação destes organismos, dentre essas substâncias destacam-se os catalisadores, também chamadas extremozimas (BURG, 2003; DALMASO et al., 2015). De modo que Cotârlet et al. (2011); Gomes e Steiner (2004); Hamid et al. (2014); Joshi e Satyanarayana (2013) garantem que celulases, amilases, xilanases, proteases, pectinases, queratinases, lipases, catalases, esterases, quitinases, fitases e peroxidases classificadas como extremozimas são de grande importância biotecnológica e muito cobiçadas por diferentes segmentos da indústria.

3.2 *Micro-organismos psicrófilos*

A temperatura ótima para o crescimento de micro-organismos psicrófilos é em torno de 15 °C, sua mínima pode ser inferior a 0 °C, no entanto, a temperatura de 20 °C ocasiona a morte microbiana. Todavia, existe outro grupo de organismos que também é capaz de se desenvolver a 0 °C, porém sua temperatura ótima de crescimento é entre 20 e 40 °C, estes são denominados psicrotolerantes (MADIGAN et al., 2016).

Psicrófilos se propagam e têm atividade metabólica até mesmo em condições de congelamento, estes micro-organismos possuem ampla diversidade de representantes dos domínios Bacteria, Archaea e Eukarya. O processo adaptativo exigiu uma evolução genotípica e em alguns casos até fenotípica, que garante assim a resistência microbiana ante os efeitos negativos de ambientes permanentemente frios (D'AMICO et al., 2006).

As bases moleculares da adaptação à psicrofilia ainda não estão completamente elucidadas, todavia, já é sabido que está relacionada com a estrutura de suas proteínas e de suas membranas. Enzimas ativas no frio exibem alto conteúdo de α -hélices e baixo de β -pregueadas nas suas estruturas secundárias (comparado a proteínas inativas no frio). A tendência da estrutura secundária em folha β é de exibir mais rigidez do que aquelas que têm maior conteúdo de α -hélices. Menos rígidas, por conseguinte, mais flexíveis e assim competentes para catalisar em temperaturas baixas. Entretanto, esse processo adaptativo não incidiu só nas proteínas, mas, também a nível membranar permitindo sua funcionalidade, e pode ser observado por meio da diferenciação de suas membranas citoplasmáticas, que contém alto teor de ácidos graxos de cadeia curta e insaturados, mantendo o estado semifluido da membrana em temperaturas congelantes. Não obstante, esses micro-organismos são capazes de produzir proteínas crioprotetoras (MADIGAN et al., 2016).

Confrontar desafios como alta probabilidade de desnaturação proteica e de formação de cristais de gelo intracelular, menor fluidez da membrana, atividade enzimática reduzida,

restrição de nutrientes, baixas taxas de transcrição, tradução e de divisão celular, incentivaram a evolução destes espécimes. Uma vez que, cerca de 85% da biosfera da terra está submetida a temperaturas abaixo de 5 °C, incluindo desde o Ártico até à Antártica, além do fundo do mar, que representa a maior parte deste percentual. O ambiente marinho é complexo, possui desde regiões profundas e desérticas, até locais onde florescem comunidades microbianas (D'AMICO et al., 2006; MARGESIN; MITEVA, 2011).

Contudo a diversidade de micro-organismos é superior onde existe maior disponibilidade de energia advinda da superfície, gerada principalmente a partir da sedimentação de material orgânico. No entanto existem espécimes capazes de sobreviver em condições tão extremas, podem até mesmo ser baseada na clivagem de água por radioisótopos de sedimentos marinhos (^{40}K , ^{232}Th e ^{238}U), gerando assim hidrogênio, peróxido de hidrogênio e radicais de hidróxido, através da radiólise de água, que fornece pequenas quantidades de oxigênio para bactérias aeróbias e hidrogênio como energia tanto para aeróbios, quanto para anaeróbios (JØRGENSEN; BOETIUS, 2007).

3.3 Micro-organismos provenientes do continente Antártico

A biodiversidade marinha e terrestre da Antártica ecológica e biogeograficamente é muito mais complexa e estruturada do que se pensava, exhibe uma variedade abastada abrangendo archaea, bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras, fungos filamentosos e cianobactérias. Todavia, os ecossistemas terrestres da Antártica são completamente distintos, conduzido por frio intenso, baixa umidade do ar, pouca disponibilidade de nutrientes e grande frequência de ambientes alcalinos (MARGESIN; MITEVA, 2011; CHOWN et al., 2015).

Segundo Cavicchioli (2015), na Antártica o desenvolvimento das comunidades microbianas é influenciado inteiramente por condições abióticas como o fluxo eólico e oceânico, por fatores ambientais como temperatura e composição mineral, bem como pelo regime anual de luz polar (Figura 1). É sabido também que os micro-organismos oriundos do oceano Antártico possuem função crucial nos ciclos biogeoquímicos oceânicos, sobretudo no sequestro do carbono (KIRCHMAN et al., 2009). Contudo, uma das maiores problemáticas enfrentadas na arrecadação de dados e material genético como subsídio para compreensão da biodiversidade Antártica, são os impactos das atividades humanas e a susceptibilidade do continente a mudanças globais (CHOWN et al., 2015).

Figura 1. Ambientes marinho e terrestre antártico (2015).



Fonte: Adalberto Pessoa Júnior (arquivo pessoal, 2015).

Atualmente, a bioprospecção de biomoléculas advindas de micro-organismos antárticos tem atraído muita atenção, principalmente com a finalidade de identificar, caracterizar e aplicá-los (Figura 2). Neste intuito, Duarte et al. (2013) e Vaz et al. (2011), realizaram a prospecção de biocatalisadores a partir da diversidade de leveduras isoladas de ambientes terrestres e marinhos da Antártica. Com o mesmo objetivo, Yu et al. (2011), Ferrés et al. (2015) e Tropeano et al. (2013), avaliaram na população bacteriana. Krishnan et al. (2016) buscaram em isolados fúngicos diversos. Segundo Cavicchioli et al. (2011), enzimas adaptadas ao frio estão entre os principais alvos em estudos com extremozimas.

Figura 2. Ilustração de pesquisador coletando amostras de solo para prospecção de micro-organismos na Antártica.



Fonte: Adalberto Pessoa Júnior (arquivo pessoal, 2015).

Micro-organismos provenientes de ambientes frios são capazes de sintetizar biocatalisadores com propriedades bioquímicas distintas (Tabela 2). As transformações para adaptar sua atuação em baixas temperaturas fizeram com que essas proteínas perdessem a rigidez estrutural, porém, em contrapartida ganharam assim mais flexibilidade, sobretudo em torno do sítio ativo, permitindo que elas apresentem ação catalítica mesmo em baixas temperaturas, porém na maioria dos casos apresentam labilidade ao calor (SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006; JOSHI; SATYANARAYANA, 2013). Todavia, a desvantagem da termolabilidade pode ser contornada. Tavano (2013) sugere que a técnica de imobilização pode ser utilizada para induzir a resistência de catalisadores promovendo o enrijecimento da estrutura tridimensional, dando maior estabilidade ao pH e à temperatura.

Tabela 2. Enzimas provenientes de micro-organismos de ambientes frios e algumas de suas características.

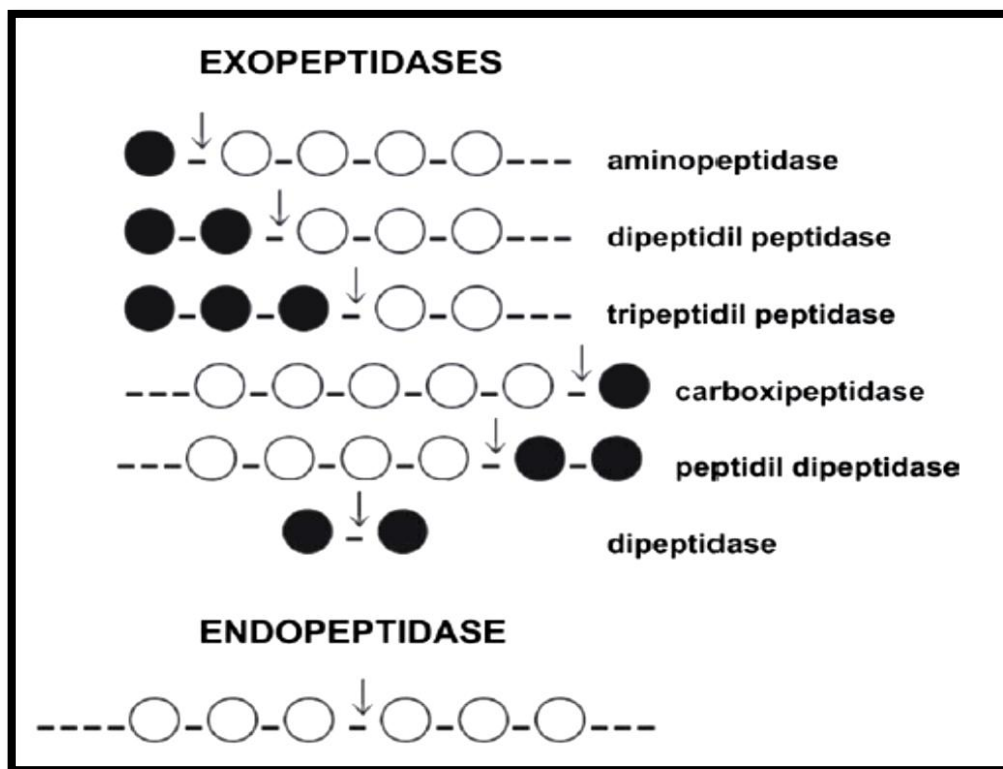
Micro-organismo	Isolado	Enzima	pH ótimo	Temperatura ótima	Referência
<i>Acremonium</i> sp. L1-4B	Líquén, Antártica.	Protease	8,0	50 °C	Nascimento et al. (2015).
<i>Nocardiopsis</i> sp.	Sedimentos, Antártica.	α -Amilase	8,0	35 °C	Zhang; Zeng, (2008).
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. NJ276	Gelo, Antártica.	Protease	8,0	30 °C	Wang et al. (2008).
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. NJ21	Sedimentos, Antártica.	β -Agarase	8,0	30 °C	Li et al. (2015).
<i>Pseudomonas</i> ADT3	Solo, Ártico.	Lipase	3,5- 8,5	22 °C	Dey et al. (2014).
<i>Pseudomonas</i> DY-A	Sedimentos marinhos.	Protease	10,0	40 °C	Zeng et al. (2003).
Psicrófilo cepa PA-43	Ouriço, Islândia.	Protease	8,3	55 – 60 °C	Irwin et al. (2001).
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> L7	Alga Antártica.	Protease	5,0	50 °C	Lario et al. (2015).
<i>Shewanella arctica</i> 40-3	Gelo, Mar Ártico.	Pululanase	7,0	45 °C	Qoura et al. (2014).

3.4 Proteases

Proteases, peptidase ou proteinases são diferentes termos empregados para nomear catalisadores que hidrolisam ligações peptídicas de proteínas, dando origem a polipeptídeos e/ou aminoácidos livres (BARRETT; RAWLINGS, 2007; NEITZEL, 2010).

O mecanismo de interação das proteases com o substrato pode categorizá-las em duas subclasses principais: exopeptidases e endopeptidases. Na Figura 3, clivando ligações peptídicas nas extremidades N ou C terminal das cadeias polipeptídicas estão as exopeptidases, enquanto que as endopeptidases vão clivar preferencialmente a parte interna da molécula (BARRET, 1994; RAO et al., 1998; TREMACOLDI, 2009; TAVANO, 2013).

Figura 3. Classificação das proteases de acordo com locais de clivagem da enzima, o símbolo (○) representa os resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica; enquanto, o (●) simboliza os resíduos de aminoácidos liberados depois da proteólise.



Fonte: Gianotti (2008).

As enzimas proteolíticas estão envolvidas nas principais funções fisiológicas dos seres vivos, desencadeando vários processos desde a morfogênese, atuando nas vias regulatórias e até mesmo na apoptose. Proteases atuam na ativação dos zimogênios, na coagulação do sangue, no sistema digestório, na modificação e transporte de proteínas através da membrana, até mesmo na lise de coágulos sanguíneos. Todavia, a multiplicidade das proteases exerce funções específicas e indispensáveis através do mesmo mecanismo de ação, sugerindo que a evolução foi a partir de um mesmo gene ancestral (NEURATH et al., 1967; RAO et al., 1998; MAURER, 2004).

Nas complexas interações entre plantas, insetos e micro-organismos, as proteases agem ininterruptamente de ambos os lados, atuantes como mecanismo de defesa de plantas contra pragas, na invasão da parede celular vegetal por fitopatógenos e até no sistema digestório de insetos (TREMACOLDI, 2009). Contudo, apesar de ser ubiquamente distribuída

na natureza, no âmbito de bioprocessamento são as fontes microbianas que representam o melhor modelo para obtenção desta proteína, exibindo vantagens como crescimento rápido e fácil manipulação genética (RAO et al., 1998; SOUZA et al., 2015).

3.4.1 Produção de proteases microbianas através de planejamentos experimentais

O constante interesse da indústria impulsiona as pesquisas de prospecção e produção de enzimas proteolíticas, uma vez que estas representam um grupo bastante expressivo com aplicações em diversos segmentos da indústria. Segundo Chaud et al. (2007) a produção microbiana merece destaque por advir de um bioprocessamento relativamente simples. Deste modo, a obtenção de catalisadores por via microbiana é vantajosa, lucrativa e reprodutível, principalmente quando as condições fermentativas (parâmetros físicos e químicos) já estão preconizadas (SOUZA et al., 2015).

No estabelecimento de parâmetros fermentativos, Oskouie et al. (2008) sugerem a utilização de planejamentos estatísticos permite identificar fatores e interações adequadas para produção da biomolécula. E é neste contexto que diversos estudos têm sido realizados visando aumentar e padronizar metodologias para obtenção de enzimas microbianas com auxílio da estatística experimental.

Souza et al. (2015) indicam que os fungos merecem destaque na produção de catalisadores, pois são capazes de realizar a bioconversão a partir de substratos de baixo custo e apenas com uma etapa de filtração já é possível separar o produto da massa miceliar. Chaud et al. (2007) afirmam que a produção de proteases pelo gênero *Bacillus* é dependente da estirpe e que pode variar de acordo com as condições nutricionais do meio de cultivo, pH, tempo de fermentação e temperatura, considerando que para cada espécie existe um conjunto de parâmetros necessários para secreção da protease específica, assim, são necessários estudos para padronizar a produção da enzima para cada cepa.

E foi neste intuito que Karan et al. (2011) aplicaram um planejamento do tipo Plackett-Burman contendo sete fatores para selecionar as variáveis significativas na produção de proteases tolerante a solventes a partir de *Geomicrobium* sp. EMB2 (MTCC 10310); Posteriormente outros cinco fatores foram alimentados em um Delineamento Composto Central e os resultados deste foram analisados pela Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). E o conjunto de planejamentos proporcionou aumento de 20 vezes na produção da enzima, pois inicialmente se obtinha 37 U/ml e no meio otimizado passou para 721,00 U/mL.

Badoei-Dalfard e Karami (2013) empregaram um planejamento fatorial fracionado (2^{4-1}) como ferramenta de seleção das variáveis independentes significativas na produção de

proteases a partir da cepa *Bacillus* sp. JER02. As quatro variáveis selecionadas foram distribuídas em um Delineamento Composto Central, a Metodologia de Superfície de Resposta foi adicionada para o estudo das interações e dos parâmetros no bioprocesso. Os resultados permitiram observar que a MSR pode ser utilizada de forma segura no desenvolvimento dos fatores de otimização e para a análise dos efeitos de interação, permitindo um aumento da produtividade e consequentemente de aplicabilidade da enzima no âmbito industrial.

Nascimento et al. (2015) por meio da fermentação submersa do fungo filamentoso *Acremonium* sp. L1-4B obtiveram uma superprodução de proteases extracelulares, empregando um planejamento fatorial 2^3 , seguido de um Delineamento Composto Central, este que foi montado a partir das tendências do teste anterior e analisado com auxílio da Metodologia de Superfície de Resposta. O conjunto de planejamentos promoveu um aumento de 0,07 U/mL (menor resultado do ensaio fatorial 2^3), para 459,45 U/mL (maior resultado do DCC), utilizando como fontes nutricionais extrato de levedura e de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill).

É notório que o emprego de ferramentas estatísticas pode prover um aumento significativo na produção de proteases microbianas. Particularmente, o uso de planejamentos experimentais é capaz de nortear o ajuste das inter-relações físicas e/ou químicas do processo fermentativo. Outra estratégia comumente utilizada em bioprocessos visa prospectar novos substratos que permitam diminuir os custos de produção, por isso, diversos resíduos e produtos da agroindústria têm sido estudados.

3.4.2 Palma forrageira como substrato no processo fermentativo

A palma (*Opuntia ficus-indica* Mill) é uma dicotiledônea da família Cactaceae, uma planta rústica adaptada a climas áridos e semiáridos, seu desenvolvimento extraordinário ocorre em condições extremas de privação de água. Sua propagação pode ser tanto de forma sexual quanto assexual, no entanto, por causa das facilidades de manejo, o modo assexual é o mais comum (EL-MOSTAFA et al., 2014). Também conhecida como palma forrageira, é cultivada em grande escala na região nordeste do Brasil. Ela é fornecida como alimento animal e ocasionalmente também é utilizada na alimentação humana (BEZERRA et al., 2012).

O gênero *Opuntia* é bem conhecido por produzir mucilagem, que é um hidrato de carbono complexo, composto por L-Arabinose, D-Galactose, L-Ramnose, D-Xilose e ácido galacturônico. Contudo, a *O. ficus-indica* Mill ainda é rica em minerais (sobretudo cálcio,

magnésio, sódio, potássio), vitaminas A e do complexo B e C, além do que, detém 17 tipos de aminoácidos. Quando comparada a outros alimentos, a palma é mais nutritiva que a couve, beterraba e até mesmo que a banana (SÁENZ et al., 2004; NUNES, 2011).

A palma é nutricionalmente rica em polifenóis, aminoácidos, vitaminas e ácidos graxos poli-insaturados, esses componentes têm atraído bastante a atenção de pesquisadores, pois já são conhecidos muitos compostos promissores derivados de cactos, que apresentam atividades biológicas como anti-inflamatória, antimicrobiana, neuroprotetoras, antioxidantes e hipoglicêmica (EL-MOSTAFA et al., 2014). E foi neste intuito que Jorge et al. (2013) utilizaram a Metodologia de Superfície de Resposta para extrair compostos polifenólicos da palma e os resultados demonstraram que estes apresentam baixa toxicidade comparado com sintéticos. Logo, a *O. ficus-indica* Mill apresenta-se como uma excelente fonte de antioxidantes naturais.

No México, Estados Unidos e Japão ela é considerada um alimento comum, porém, no Brasil seu uso na alimentação humana ainda é visto como sinônimo de miséria e pobreza, que é consequência de um preconceito midiático que relaciona a planta apenas com a ração animal. No entanto, a palma pode ser utilizada na elaboração de doces, sucos, sorvete, saladas e pratos cozidos. Por conter alto teor de fibras solúveis e insolúveis atua no bom funcionamento do sistema digestivo, sugerindo que a mesma pode prevenir a concentração de elementos tóxicos e cancerígenos no organismo (NUNES, 2011).

A substituição de substratos comerciais por outros provenientes da agroindústria são atrativos excepcionais na obtenção de enzimas, inicialmente por ser uma fonte limpa, que não gera resíduos e efluentes tóxicos. E ainda, são economicamente viáveis e ocorrem de forma abundante, podendo ocasionar redução nos custos de produção. Neste contexto, Gomes et al. (2014) avaliaram o potencial biotecnológico de *Aspergillus tamarii* URM 4634 e *Aspergillus japonicus* URM 5633 na produção sinérgica de fítases, xilanases e celulasas, utilizando extrato de palma forrageira, farelo de entrecasca da mandioca e água de maceração de milho como fontes de nutrientes em sistema fermentativo submerso.

Santana et al. (2012) usaram exclusivamente palma forrageira como substrato na fermentação em estado sólido por *Aspergillus niger* para produzir amiloglucosidase. Utilizando o mesmo método, Carvalho et al. (2012) empregaram palma doce como matéria prima na síntese de enzimas lignocelulósicas por *Aspergillus niger*, sem necessidade de qualquer outro indutor. Maciel et al. (2011) visando redução dos custos montou um sistema de fermentação em estado sólido, utilizando a palma forrageira na produção de endo-

poligalacturonase (endo-PG), exo-poligalacturonase (exo-PG), pectina liase (PL) e pectinesterase (PE) por *Aspergillus niger* URM 4645. A produção destas enzimas com uso do planejamento fatorial 2³ avaliou a influência da quantidade de palma, do inóculo e de diferentes temperaturas.

Sumarizando, pesquisas biotecnológicas que prospectam matéria prima de baixo custo e micro-organismos eficientes para a produção de proteases são incentivadas economicamente, devido as suas inúmeras possibilidades de aplicações industriais deste catalisador (CHAUD et al., 2007).

3.4.3 Aplicação de proteases

Proteases muito comumente são empregadas em diversos segmentos da indústria, multifuncionais, exibem vantagens como alta seletividade e mínimo impacto ambiental contrário aos catalisadores sintéticos. Indispensáveis nos segmentos alimentícios são utilizadas na manufatura de laticínios, panificação, produção de cervejas, hidrolisados de peixe, no amaciamento e recuperação de carne. Todavia, uma parte destas proteínas é direcionada para a biorremediação e na síntese de fármacos (MAURER, 2004; TAVANO, 2013; VITOLO, 2015).

A indústria de detergentes é uma das que mais absorve proteases microbianas, sendo que a enzima vai atuar de forma específica na remoção de diferentes tipos de manchas provenientes de fontes proteicas como alimentos, sangue e outras secreções corpóreas. Porém, para desempenhar tais funções, estes catalisadores devem apresentar pré-requisitos como tolerância a agentes quelantes e oxidantes, atividade e estabilidade em pH alcalinos e também compatibilidade com a temperatura de lavagem (CHAUD et al., 2007). De acordo com Zambare et al. (2011) seu uso no amaciamento e depilação de couro também é muito indicado, principalmente por sua capacidade de atuar na redução dos efluentes resultantes do processo.

A transformação de características funcionais de proteínas pelo uso de enzimas proteolíticas tem recebido grande enfoque, incentivando a conexão entre os estudos de biotransformação. A proteólise favorece a alimentação humana, trazendo benefícios que vão desde a diminuição de compostos alergênicos, atuação em melhorias sensoriais e digestivas, até mesmo na liberação de peptídeos bioativos (TAVANO, 2013; HIDALGO et al., 2015; LIMA et al., 2015; KETNAWA et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

De modo que, a descoberta de novas enzimas microbianas é de extrema importância científica, principalmente aquelas proteínas com especificidades distintas e que podem ser

aplicadas na modificação de proteínas gerando hidrolisados complexos e de composição peptídica diversificada (OLIVEIRA et al., 2015).

3.5. Hidrolisados proteicos

A hidrólise enzimática de proteínas apresenta vantagens do ponto de vista tecnológico, uma vez que é possível ter o controle adequado do processo, porque enzimas têm mecanismo de ação específico, contrário dos métodos de hidrólise ácida ou alcalina que são inespecíficos. Proteases hidrolisam a ligação peptídica entre os aminoácidos, gerando uma mistura complexa composta por aminoácidos livres e muitos peptídeos com massa e sequência diferente (CLEMENTE, 2000).

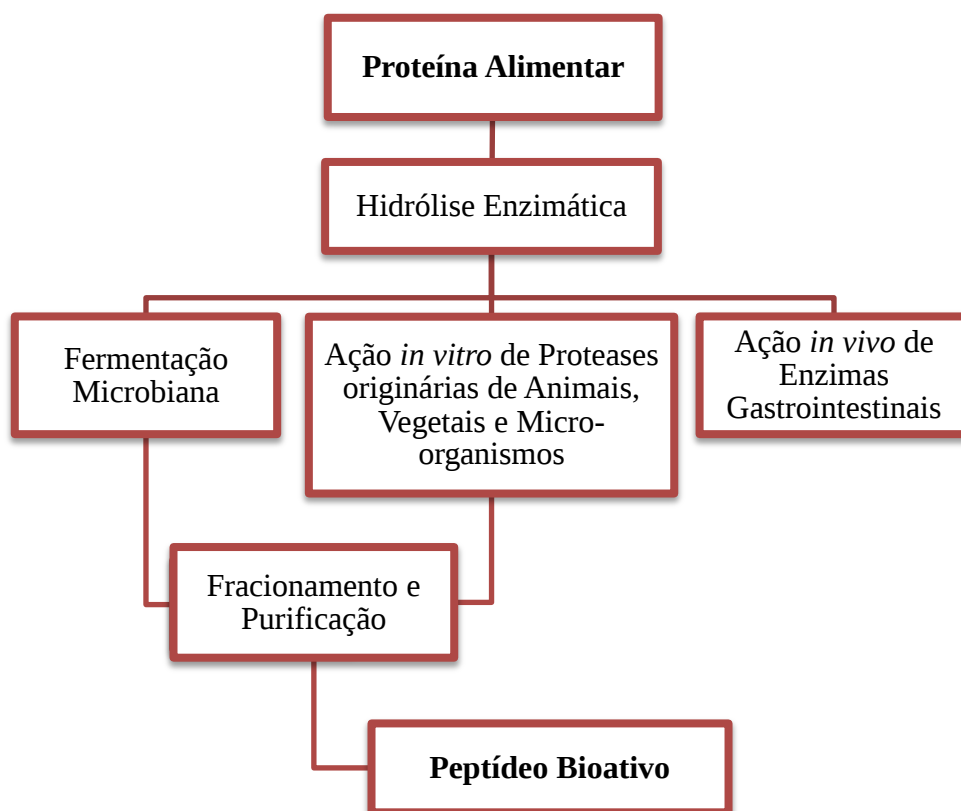
Desta forma, o mecanismo de atuação das enzimas proteolíticas pode ser utilizado como ferramenta fundamental no processo de hidrólise, sendo que a escolha de endopeptidase ou exopeptidases vai ter interferência direta no produto final, em suas características físicas, químicas e nutricionais. As propriedades conformacionais e funcionais da proteína podem ser modificadas em sua totalidade, por isso, torna-se tão necessário o estudo dos principais parâmetros envolvidos na reação, desde a concentração da fonte proteica, o catalisador, a relação entre enzima e substrato, temperatura e pH (CLEMENTE, 2000; ROMAN; SGARBIERI, 2005; OLIVEIRA et al., 2015).

Hidrolisados de diferentes fontes proteicas como queratina (FONTOURA et al., 2014), proteína de soja (OLIVEIRA et al., 2015), caseína bovina e caprina (ZHANG et al., 2016), caseinato bovino (ARRUDA et al., 2012; LUO et al., 2014; HIDALGO et al., 2015), proteína do soro de queijo de ovelha (CORRÊA et al., 2014), caseinato ovino (CORRÊA et al., 2011), gelatina de pele de peixe (KETNAWA et al., 2016), caseína caprina (LIRA et al., 2010; ESPEJO-CARPIO et al., 2013), proteínas miofibrilares suína (SAIGA et al., 2003) e caseína de leite de camelo (KUMAR et al., 2016) têm sido estudados com a finalidade de descobrir novos compostos bioativos.

Na Figura 4 é possível identificar algumas das formas mais comuns de hidrólise de proteínas de alimentos que tendem à liberação de bioativos. A proteólise pode ocorrer já no processo fermentativo com uso de culturas microbianas proteolíticas. Outra opção é a hidrólise por meio de enzimas comerciais. No entanto, esse processo também ocorre *in vivo* de forma espontânea, uma vez que, as proteínas ingeridas na alimentação são hidrolisadas por enzimas endógenas do trato gastrointestinal dos animais (AGYEI; DANQUAH, 2011; AGYEI et al., 2016).

Porém, etapas cruciais do processamento de hidrolisados proteicos abrangem desnaturação enzimática, separação e por vezes até purificação do produto final, para isso, é comum utilizar métodos cromatográficos complexos, envolvendo equipamentos como HPLC, UPLC e FPLC, o que garante elevado grau de pureza, no entanto, suscita altos custos. Contudo, a escolha do método de separação depende da finalidade do produto, pois quando não há muita exigência por pureza, podem ser empregadas técnicas simples como é o caso da ultrafiltração, que é eficiente no fracionamento por tamanho molecular, podendo reter a fonte proteica não hidrolisada junto com os catalisadores e também possíveis compostos indesejáveis, permeando apenas o produto e alguns sais (CLEMENTE, 2000; KORHONEN, 2009).

Figura 4. Formas de obtenção de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de proteínas alimentares.



Fonte: Danquah e Agyei (2011), adaptado.

Os compostos bioativos provenientes da hidrólise de proteínas alimentares podem ser novamente adicionados nos alimentos, tornando-os nutracêuticos, funcionais, atuantes na redução do risco de doenças e até mesmo na promoção da saúde. Estas frações proteicas podem ser também inseridas na elaboração de suplementos e na modelagem de fármacos. Entretanto, para que isso aconteça muitos estudos científicos, ensaios clínicos bem conduzidos, assim como a regulamentação e legislação de peptídeos bioativos como ingredientes terapêuticos precisam ser bem avaliados (KORHONEN; PIHLANTO, 2006).

Com os avanços em todos os segmentos da ciência e tecnologia de alimentos, uma nova linha de pesquisa voltada para compostos biogênicos visa a prospectar peptídeos bioativos nos alimentos, buscando satisfazer as necessidades dos consumidores, estes que, cada dia mais são atraídos pelo potencial terapêutico de substâncias de ocorrência natural. De modo que, é cabível que a ampliação das pesquisas neste âmbito possa favorecer o desenvolvimento de estratégias para utilizar a funcionalidade de tais moléculas na prevenção e no tratamento de doenças (DANQUAH; AGYEI, 2012; AGYEI et al., 2016).

3.6 Caseína

O leite é um alimento indispensável na dieta de vários países do mundo, trata-se de uma emulsão líquida formada, sobretudo por água, gordura, lactose, minerais, proteínas e vitaminas. Dentre seus principais constituintes, as proteínas são os mais importantes no âmbito tecnológico, principais substâncias responsáveis pela mediação de características organolépticas e funcionais dos produtos lácteos. As caseínas destacam-se como proteínas do leite de maior valor econômico, uma vez que, suas propriedades físico-químicas conferem grande aplicabilidade nas indústrias de alimentos e farmacêutica (FOX, 2001; FOX, 2009).

Formada por uma cadeia contendo 199 resíduos de aminoácidos a caseína α_{s1} apresenta massa molecular de 23,6 kDa, enquanto a α_{s2} é em torno de 23,5 a 24 kDa e é constituída por 207 resíduos. A principal configuração da β -caseína é formada a partir de 209 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 24 kDa. Por causa da sequência e do conteúdo de aminoácidos, as frações de α e β -caseínas possuem estrutura flexível, sobretudo por causa do alto teor de prolina na cadeia polipeptídica. A κ -caseína por sua vez, é a única fração glicosilada, que ocorre com trissacarídeo ou tetrassacarídeo. Seu monômero tem 19 kDa e sua principal função é manter a integridade micelar, por isso, boa parte da κ -caseína fica disposta na superfície da micela estabilizando sua estrutura (RASMUSSEN et al., 1999; SGARBIERI, 2005; FOX, 2009).

A maior parte da caseína no leite está presente na forma de partículas coloidais, conhecidas como micelas de caseína, são estruturas esféricas, com diâmetro que pode variar entre 50 e 500 nm e massa molecular entre 10^6 e 3×10^9 Da. São construídas a partir de unidades menores chamadas submicelas (Figura 5), de composição mista que pode ser dividida em dois grupos principais, um contendo sobretudo α_s e β -caseína, e o outro com α_s e κ -caseína. As micelas apresentam a proporção de 3:1:3:1 de caseína α_{s1} , α_{s2} , β e κ , respectivamente (ROLLEMA, 1992; SGARBIERI, 2005; FOX, 2009).

De acordo com Sgarbieri (2005), quando submetidas a altas temperaturas ou na preparação de queijos por adição enzimática, as micelas de caseína presentes no leite sofrem a dissociação da κ -caseína na sua superfície, causando quebra da força de repulsão eletrostática (micelas intactas são carregadas negativamente) e desestabilização estérica, resultando na instabilidade das micelas que se aglomeram sob a influência do Ca^{2+} , desenvolvendo assim o coágulo.

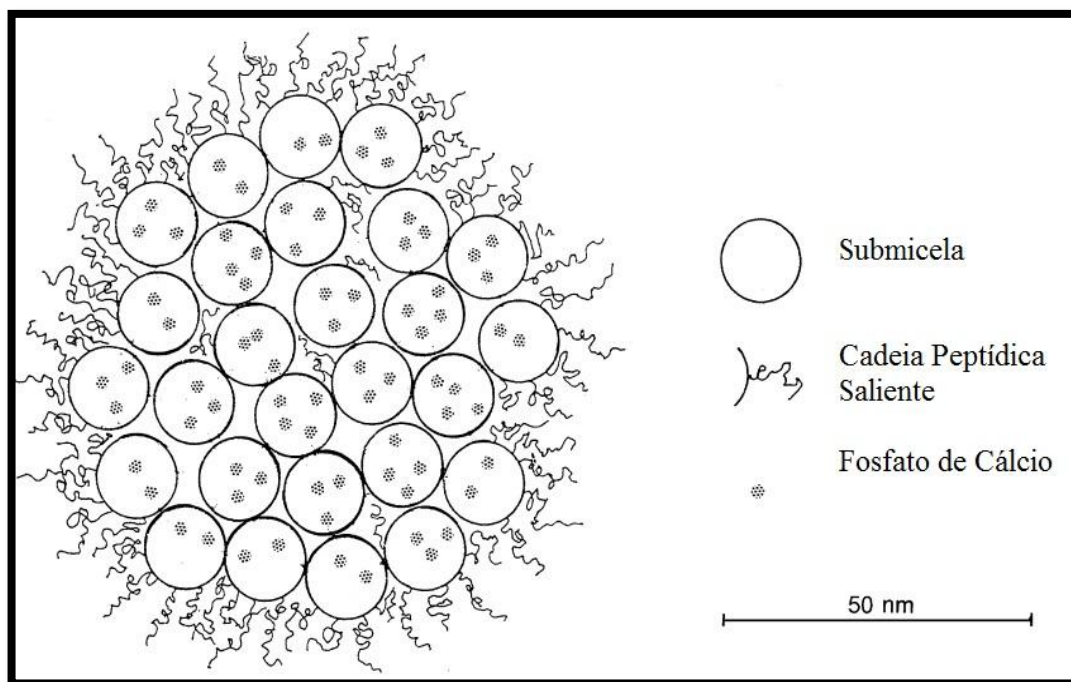
Micelas de caseína são ubíquas no leite de todas as espécies conhecidas, sugerindo imensurável importância fisiológica e ou nutricional para os mamíferos. Já é sabido que são responsáveis pela coloração esbranquiçada do leite, pelo transporte de cálcio e o fósforo e para o desenvolvimento do neonato, já que o fósforo de cálcio precipitaria dentro da glândula graças a sua incompatibilidade com o pH do leite. Além disto, acredita-se que as micelas foram arquitetadas para serem coaguladas pela quimosina no estômago do neonato, retardando a passagem de seus nutrientes para o intestino delgado, mantendo assim seu estado nutricional (FOX; BRODKORB, 2008).

Embora compartilhem das mesmas caseínas, os leites de cabra, vaca e ovelha apresentam características distintas nas suas estruturas micelares, que vão desde o diâmetro das micelas, grau de hidratação e mineralização (PARK et al., 2007). Caseínas presentes no leite de vaca e as proteínas do soro podem causar reações alérgicas em alguns indivíduos. Isso incentiva a ampliação de novos estudos a partir de proteínas do leite caprino, que por sua vez apresenta alergenicidade reduzida quando comparado ao bovino. Estudos mencionam a caseína α_{s1} como um dos principais compostos alergênicos do leite (PARK, 2009; AHMED et al., 2015).

Contudo, uma das principais diferenças entre o leite de cabra e de vaca está relacionada com as concentrações das frações de caseína α_{s1} , α_{s2} , β e κ . As proporções de κ -caseína e β -caseína são mais elevadas no leite de caprino que no bovino, porém, a concentração de α_{s1} é muito menor (PARK et al., 2007). O leite de caprino oferece

propriedades nutricionais e composicionais tão promissoras quanto do bovino, entretanto, sua maior desvantagem está relacionada com suas propriedades sensoriais, que lhe proporciona menor aceitação.

Figura 5. Seção transversal do modelo de uma micela de caseína proposto por Walstra (1999).



Fonte: Walstra (1999).

A caseína, assim como as demais proteínas do leite, possui sequências de peptídeos bioativos inseridas na sua cadeia polipeptídica, na maioria das vezes esses fragmentos permanecem inertes, só apresentando atividade biológica quando enfim sua sequência é desprendida de sua proteína nativa. Essas fontes proteicas são consideradas importantíssimas, e por isso têm sido alvo de muitos estudos (KORHONEN, 2009; FONTOURA et al., 2014).

3.7 Peptídeos bioativos

É sabido que os alimentos são extremamente necessários para a nutrição do ser humano, no entanto, eles também são indispensáveis em carácter não nutritivo. Pois são carreadores de substâncias reguladoras de natureza intrínseca do alimento, que podem ser originadas a partir do seu processamento, ou até mesmo geradas no trato gastrointestinal do

indivíduo. São moléculas fisiologicamente indispensáveis para os organismos, influentes mediadoras da boa saúde e por isso são rotuladas moléculas bioativas ou compostos biogênicos (MEISEL, 2004).

Encriptada em uma única proteína pode haver uma grande diversidade de sequências peptídicas que podem ser facilmente libertadas da matriz por proteólise, sugerindo que proteínas de alimentos são excelentes fontes para a obtenção destas biomoléculas (DANQUAH; AGYEI, 2012). Estes fragmentos de proteína com atributos bioquímicos capazes de exercerem atividades regulatórias no organismo são nomeados peptídeos bioativos, podendo atuar na saúde do ser humano. Quando são gerados a partir de proteínas alimentares, estas moléculas são reconhecidas pelo organismo como componentes naturais (KRÜGER; CÂNDIDO, 2009; DANQUAH; AGYEI, 2012).

Peptídeos são biomoléculas formadas a partir da junção de dois ou mais aminoácidos por meio de ligações peptídicas. Usualmente, as unidades de aminoácidos que compõem o peptídeo são chamadas de resíduos, uma vez que, na formação do peptídeo, cada aminoácido perde um hidrogênio do seu grupamento amina e a parte hidroxila do seu grupo carboxila. Diferidos entre si por seu comportamento de ionização, os peptídeos podem apresentar uma ampla variedade de massa molecular (NELSON; COX, 2000; MACHADO, 2004; KADAM et al., 2015).

O conteúdo de aminoácidos e sua disposição na sequência estão diretamente relacionados à sua atividade, muitos dos peptídeos conhecidos por apresentar bioatividade, têm sequência que varia entre dois a vinte resíduos de aminoácidos. E quando estes são liberados a partir da hidrólise de proteínas, comumente retêm algumas características físicas e químicas inerentes a sua proteína nativa (KORHONEN, 2009; AGYEI et al., 2016).

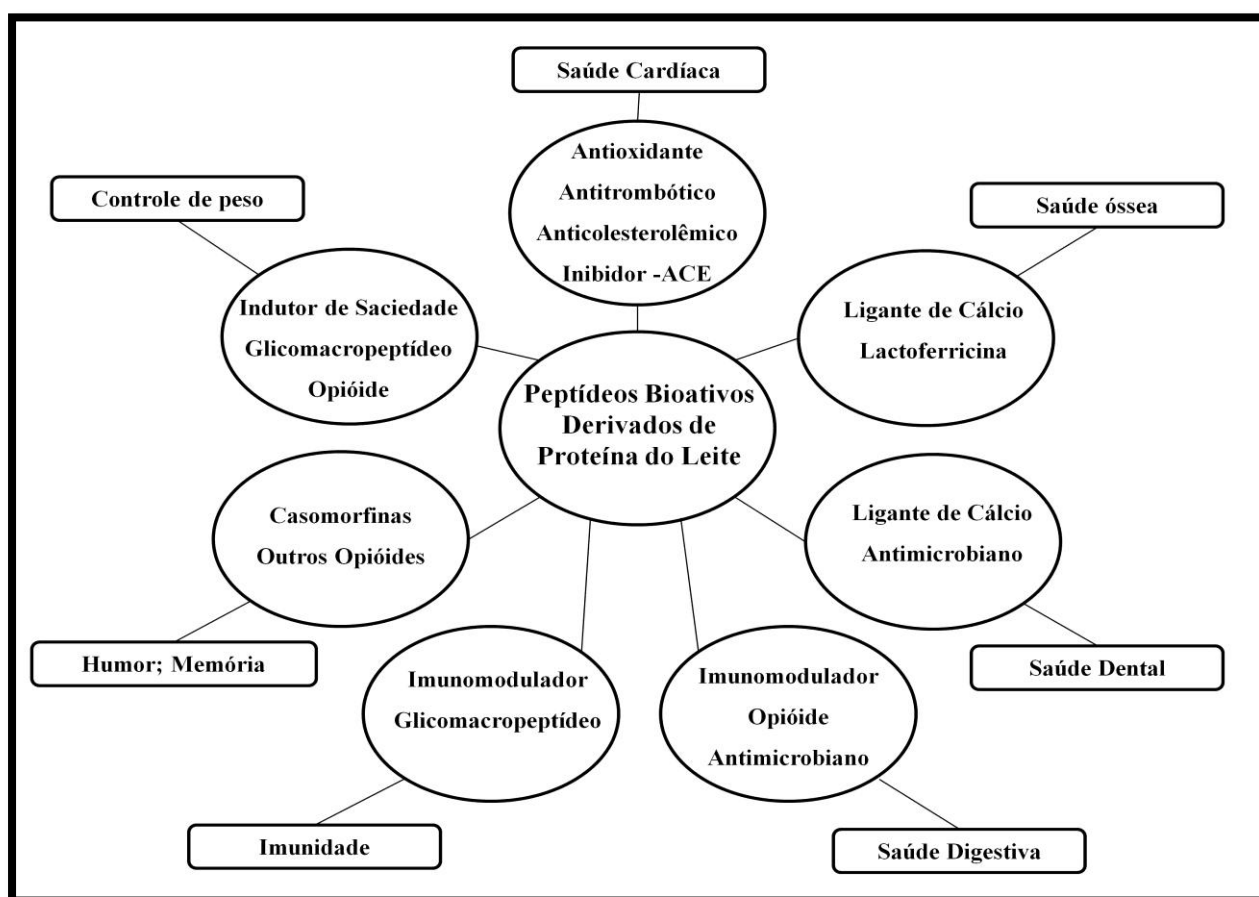
Estudos apontam que peptídeos lácteos podem atuar na regulação fisiológica de modelos animais e em humanos, a somatória destas informações é de extrema importância científica, conjectura que, num futuro próximo possam ser aplicadas na redução de doenças crônicas (KORHONEN; PIHLANTO, 2006). Existindo assim a necessidade constante de novos estudos envolvendo proteínas derivadas de leite, com a finalidade de consolidar os conhecimentos já existentes sobre estas moléculas.

3.8 Peptídeos bioativos derivados de proteína do leite

Diferentes peptídeos lácteos têm sido identificados nos últimos anos, estudos revelam que proteínas do leite são precursores excepcionais de fragmentos multifuncionais que podem inferir no sistema cardiovascular, digestório e nervoso, bem como no fortalecimento dos

ossos, no aumento das defesas imunológicas e auxilia no controle de peso (Figura 6). Esses peptídeos biologicamente ativos podem desempenhar suas atividades mesmo em baixas concentrações no organismo e também podem atuar em sinergia com outras substâncias não proteicas (KORHONEN, 2009; KRÜGER; CÂNDIDO, 2009; AKALIN, 2014).

Figura 6. Funcionalidade de peptídeos bioativos provenientes de proteínas do leite e seus potenciais alvos de atuação.



Fonte: Korhonen (2009), adaptado.

Contudo, existem muitas sequências peptídicas derivadas de leite que são multifuncionais, ou seja, um mesmo peptídeo pode desempenhar várias atividades biológicas (MEISEL, 2004). Naturalmente as proteínas lácteas podem liberar peptídeos bioativos de variados comprimentos gerados partir das clivagens que ocorrem no trato gastrointestinal, uma vez que nele a proteína intacta entra em contato com proteases como tripsina, quimotripsina e pepsina, alguns dos peptídeos originados serão subsequentemente digeridos

por proteases presentes na superfície das células epiteliais formando outros pequenos peptídeos e aminoácidos (JÄKÄLÄ; VAPAATALO, 2010).

Testes com proteínas lácteas provenientes de diferentes modelos animais com o intuito de descobrir novas biomoléculas tem sido realizados com frequência. Nesse contexto, Park (2009) sugere que as frações α_s , β , e κ -caseína do leite de cabra são mananciais de bioativos. Ahmed et al. (2015) concluíram que peptídeos provenientes de proteína de leite caprino são fascinantes agentes na terapêutica e prevenção do estresse oxidativo, podendo ser aplicado nas indústrias nutracêutica e farmacêutica. E de acordo com Zhang et al. (2016), peptídeos provindos da caseína caprina exibem competência *in vitro* como ingredientes funcionais para diabéticos.

Arruda et al. (2012) demonstraram que a proteólise da caseína bovina por proteases contidas no látex de *Jacaratia corumbensis* foi importante na liberação de peptídeos antimicrobianos. Segundo Akalin (2014) o interesse em peptídeos antimicrobianos lácteos tem aumentado principalmente devido seu excelente potencial de utilização nas indústrias de síntese de medicamentos e de preservação de alimentos. Cheung et al. (2015) aplicaram uma exopeptidase no soro de leite bovino, promovendo em hidrolisados melhorias organolépticas, menor amargor, e estes passaram a inibir a Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).

Ahmed et al. (2015) sugerem o reaproveitamento de resíduos da indústria de queijo como fonte alternativa, ecologicamente correta e econômica para produção de hidrolisados enzimáticos. Corrêa et al. (2014) investigaram a proteólise de soro de queijo de ovelha por uma preparação de proteases de *Bacillus* sp. P7, derivando em hidrolisados com propriedades antioxidantes e inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina, podendo ser enquadrado como ingrediente funcional, atraindo assim uma abordagem interessante para valorização deste produto abundante nos laticínios.

Existem algumas questões que dificultam na comercialização peptídeos biogênicos, podemos destacar a carência de informações sobre a biodisponibilidade destas frações proteicas no organismo depois de passar pelo trato digestório, assim como a respeito de seus mecanismos de ação. De acordo com Samaranayaka e Li-Chan (2011) outras limitações tecnológicas como altos custos para produção, escassez de metodologias de purificação em grande escala, baixa reprodutibilidade e o acarretamento de problemas organolépticos são entraves que limitam sua utilização.

Entretanto, no isolamento de bioativos a otimização de metodologias pode ser utilizada como uma estratégia para diminuir os custos e o tempo, neste intuito, a filtração por

eletro membrana tem sido aplicada. Esse método alternativo é capaz de separar moléculas carregadas fortemente, pois a técnica combina a filtração por membrana com eletroforese, entretanto, é mais específica e quando comparada a cromatografia é uma tecnologia mais econômica (AGYEI; DANQUAH, 2011).

Com respeito à biodisponibilidade, Kadam et al. (2015) sugerem que fármacos baseados em peptídeos sejam encapsulados com polímeros biodegradáveis mediado por ultrassom, a fim de melhorar sua estabilidade e disponibilidade no organismo. Também recomendam o uso de sonoforese e ultrassom de baixa frequência no transporte destes peptídeos de elevada massa molecular.

Segundo Park et al. (2007) as proteínas do leite são extraordinários mananciais de sequências peptídicas com potencial antimicrobiano, opióide, anti-hipertensivo, imunomodulatórios ou até mesmo antioxidante. Já são comercializados produtos contendo peptídeos anticariogênico, anti-hipertensivos, que agem na ligação mineral, no aumento da saciedade e no alívio de sintomas do estresse (KORHONEN, 2009). Agyei et al. (2016) sugerem que peptídeos extraídos a partir de proteínas de alimentos sejam redirecionados em produtos consumíveis, tais como bebidas lácteas e sucos de fruta.

3.9 Peptídeos antioxidantes

O acúmulo de radicais livres e a oxidação lipídica provocam reações danosas nas biomoléculas do organismo e nos alimentos, levando ao desenvolvimento de doenças e à deterioração de produtos alimentícios. O estresse oxidativo ocasionado por Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) advém do ambiente ou podem ser originadas no próprio organismo. A ERO e a ERN atuam preferencialmente nas moléculas de maior importância para as membranas das células, como o DNA, o RNA e as proteínas. Contudo, avarias ao DNA e ao RNA são as mais graves. No caso do DNA, uma vez que sua cadeia é rompida, ela pode se conectar numa disposição diferente, desordenando as bases e consequentemente promovendo mutação. O acúmulo desse desarranjo pode acarretar na oncogênese (BARREIROS et al., 2006; KETNAWA et al., 2016).

A oxidação de lipídeos na membrana celular interfere no transporte ativo e passivo, ocasionando lise celular. Quando a oxidação lipídica acontece no sangue atinge diretamente as veias e artérias, promovendo o amontoamento desses lipídeos que resulta no desenvolvimento da arteriosclerose, podendo ocasionar também infarto, trombose ou AVC. Todavia, micromoléculas e macromoléculas de procedência endógena e que também podem

ser ingeridas por meio da dieta são capazes de agir na proteção do organismo inibindo ou regenerando os danos oxidativos (BARREIROS et al., 2006).

A proteólise de proteínas alimentícias apresenta-se como um processamento satisfatório na liberação de peptídeos antioxidantes. Os alimentos mais estudados como fontes proteicas estão os ovos, leite, peixes e soja (SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011). Hidrolisados de peixe tem se destacado no âmbito da pesquisa com antioxidantes, conceitos atuais sugerem a substituição de antioxidantes sintéticos pelos naturais, uma vez que estes são mais bem tolerados pelo organismo (KETNAWA et al., 2016).

Diversos estudos visam à prospecção de peptídeos antioxidantes nas caseínas do leite de diferentes espécies. Em hidrolisados de caseína caprina, Gobba et al. (2014) observaram que as frações que exibiram maior potencial na eliminação de radicais livres continham elevada concentração de tirosina, destacando a importância deste aminoácido em preparações antioxidante. Contudo, as frações peptídicas com mais fenilalanina foram mais eficientes evitando a formação de produtos secundários da oxidação de lipídeos.

Tripeptídeos que apresentam resíduos de tirosina e triptofano na extremidade c-terminal da cadeia polipeptídica têm forte atuação no sequestro de radicais, porém são pouco eficientes na erradicação de peroxinitrito e neste caso, os mais eficientes apresentam cisteína na terminação (SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011). Ahmed et al. (2015) identificaram nas frações com maior atividade antioxidante no mínimo um resíduo de prolina na sua sequência, no entanto, foram encontrados também muitos peptídeos contendo prolina e histidina.

Gobba et al. (2014) observaram que as frações de hidrolisado caprino com peptídeos menores que 1 kDa apresentaram maior potencial na eliminação do radical ABTS^{•+}. Segundo Ahmed et al. (2015) em geral peptídeos são mais fortes antioxidantes do que suas proteínas nativas intactas. Foi nesse contexto que Corrêa et al. (2014) hidrolisaram o soro de queijo de ovelha com proteases de *Bacillus* sp. P7 e ponderaram que estes podem ser utilizados no retardo da oxidação de lípidos e da deterioração de alimentos.

3.10 Peptídeos antimicrobianos

Antibióticos agem de diferentes formas provocando um efeito deletério nos micróbios, ocasionando a morte no caso dos agentes bactericidas, ou o retardo do crescimento como é o caso dos bacteriostáticos. Os principais mecanismos de ação dos antimicrobianos estão relacionados com a inibição das sínteses de parede celular, proteínas, ácidos nucleicos, metabólitos essenciais e também por dano à membrana plasmática (TORTORA et al., 2010).

Peptídeos antimicrobianos são potentes, específicos e cada molécula pode apresentar um ou mais mecanismos de ação contra células microbianas. Algumas características como tamanho, sequência, carga, conformação e propriedades de anfipaticidade e hidrofobicidade do peptídeo vão influir na sua efetividade e em seu espectro de atuação (BROGDEN, 2005).

Um bom modelo para o entendimento são os peptídeos catiônicos, habitualmente ocorrem na natureza e são apreciados como componentes das defesas inatas, principalmente por atuar na modulação de respostas inflamatórias e apresentar atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e positivas, fungos, vírus e parasitas patogênicos. Grande parte destas sequências catiônicas são pequenas, anfipáticas e possuem estrutura α -helicoidal (DEVINE; HANCOCK, 2002; KITTS; WEILER, 2003; HANCOCK; SAHL, 2006). Uma das estratégias dos peptídeos catiônicos antimicrobianos está relacionada com a sua interação com a aniônica membrana celular dos micro-organismos, abastada em fosfolipídios, em que atuam modificando sua permeabilidade, levando à perda de metabolitos essenciais, desencadeando assim o processo de lise (KITTS, WEILER, 2003).

O tamanho dos peptídeos catiônicos antimicrobianos pode variar em torno de 12 a 50 resíduos de aminoácidos, enquanto os aniônicos entre 6 e 59, porém, a atividade foi observada também em dipeptídeos e tripeptídeos. Nas suas sequências é comum encontrar resíduos de lisina, arginina, alanina, leucina, fenilalanina, triptofano, tirosina, valina e isoleucina. Peptídeos aniônicos exibem alto conteúdo de ácidos aspártico e glutâmicos, enquanto os catiônicos têm muita lisina e arginina mediadoras sua carga. Ademais, sua conformação estrutural, suas características de anfipaticidade são outros componentes que fazem parte dos mecanismos de ação deletéria contra micro-organismos patogênicos (BROGDEN, 2005).

Peptídeos alimentares são ingredientes importantes nos alimentos funcionais, estudos *in vitro* e *in vivo* atualmente são realizados como o intuito de aprimorar e desenvolver novas drogas, inclusive antimicrobianas. Porém, alguns desafios são encontrados ao longo do processo, uma vez que, para apresentar bioatividade estes fragmentos de proteína precisam ser libertados de sua matriz e direcionados para seu local de atuação sem sofrer degradação (AKALIM, 2014). Peptídeos provenientes de proteínas do leite exibem muitos benefícios que podem ser explorados pelas indústrias alimentícia e farmacêutica, uma vez que eles são gerados a partir de um substrato seguro, de uso comum, abundante e que possui baixo valor agregado, suscitando assim vantagens econômicas e biotecnológicas (ALAMDARI; EHSANI, 2017).

O leite comporta diferentes proteínas com atividade antimicrobiana que podem atuar sozinhas ou em sinergia. Por conseguinte, esse alimento é considerado um precursor de diversos peptídeos bioativos, muitos destes, derivados da hidrólise por enzimas digestivas ou microbianas. Contudo, ainda são poucos os peptídeos antimicrobianos identificados e caracterizados quanto a seus mecanismos de atuação (KITTS, WEILER, 2003; BENKERROUM, 2010). Estes peptídeos antimicrobianos derivados de proteínas do leite precisam ser submetidos a técnicas de purificação, caracterização e identificação, para enfim direcioná-los a testes *in vivo* visando efeitos colaterais mínimos.

De acordo com Wang; Wang (2004) é importante conhecer a estrutura e propriedades intrínsecas dos peptídeos, possibilitando assim a melhoria de modelos naturais e a construção de novas sequências. Para possibilitar a pesquisa com peptídeos antimicrobianos vários bancos de dados estão sendo inseridos na rede, dentre essas bases podemos destacar a *Antimicrobial Peptide Database - APD*, criada partir de informações descritas na literatura e disponível no endereço (<http://aps.unmc.edu/AP/>) e fornece dados como sequência, função, estrutura, carga. Uma excelente ferramenta para análises estruturais e funcionais, hoje expandida para APD3 contendo peptídeos antibacterianos, antivirais, anticancerígenos, anti-HIV, antifúngicos e antiparasíticos (WANG; WANG, 2004; WANG et al., 2009; WANG et al., 2016).

3.11 Peptídeos inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina

A Enzima Conversora de Angiotensina converte a angiotensina I em angiotensina II, esta que por sua vez é um potente vasoconstritor que vai atuar nas artérias, veias e na liberação de aldosterona, aumentando a concentração de sódio e culminando na elevação da pressão sanguínea (JÄKÄLÄ; VAPAATALO, 2010).

Em estudos que mensuram a atividade da ECA *In vitro* comumente são utilizados três substratos distintos, um natural a angiotensina I ou outros dois sintéticos o FAPGG e HHL. Contudo, a utilização dos substratos sintéticos é mais comum, uma vez que estes são confiáveis, economicamente viáveis e podem ser aplicados em testes que determinam a inibição da ECA a partir de diferentes biomoléculas (HENDA et al., 2013).

Muitas pesquisas têm focado na prospecção de peptídeos derivados de leite que sejam capazes de inibir a ECA com o intuito de empregá-los na regulação da pressão arterial. Uma das vantagens de utilizar esses peptídeos para prevenir ou tratar a hipertensão é que geralmente eles não provocam efeitos colaterais, pois, são bem tolerados pelo organismo. Essa característica pode ser explorada tanto no desenvolvimento de fármacos, quanto, em

nutracêuticos, uma vez que, eles também apresentam valor nutritivo (JÄKÄLÄ; VAPAATALO, 2010; HENDA et al., 2013).

Espejo-Carpio et al. (2013) observaram que grande parte dos peptídeos inibidores de ECA obtidos em seu estudo tinham massa molecular menor que 2 kDa. Essa característica avaliada em hidrolisados de proteínas do leite caprino por subtilisina e tripsina, sugere que a utilização de membranas de corte pos hidrólise pode ser útil na separação destes peptídeos. Resultados parecidos também foram notados por Cheung et al. (2015), os autores detectaram que a inibição da ECA foi desempenhada por peptídeos com massa entre 200 e 1000 Da. Os hidrolisados de soro de leite bovino obtidos pela ação de uma exopeptidase foram fracionados por cromatografia de exclusão molecular e os testes foram realizados *in vitro* e confirmados *in vivo* em ratos hipertensos.

Hidrolisados de ovo por tripsina, papaína e por uma combinação das duas foram ultrafiltrados por membrana de *cut-off* de 3 kDa e posteriormente purificados por fase reversa em HPLC. O Peptídeo FESNFNTQATNR com massa molecular de 1428,6 Da, apresentou potencial de inibição da ECA. A digestão gastrointestinal *in vitro* pode originar outras frações peptídicas inibidoras de ECA (ASOODEH et al., 2012). Yamada et al. (2013) identificaram um tripeptídeo MKP (Met-Lys-Pro) derivado da caseína α_{S2} bovina que apresentou forte atividade anti-hipertensiva *in vitro* e *in vivo*.

Estudos que correlacionam atividade e estrutura de diversos peptídeos inibidores de ECA demonstraram que a enzima conversora de angiotensina prefere substratos com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (MEISEL, 2004). Em alguns alimentos lácteos oriundos de processos fermentativos a presença do cálcio pode aumentar a atividade hipotensora, entretanto, ainda tem sido pouco estudada a relação entre o cálcio e a atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina (GONZALEZ-GONZALEZ et al., 2011).

4. REFERÊNCIAS

- AGYEI, D. et al. Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and Bioproducts Processing*, v. 98, p. 244-256. 2016.
- AGYEI, D.; DANQUAH, M. K. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, v. 29, p. 272-277. 2011.
- AHMED, A. S. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. *Food Research International*, v. 74, p. 80-88. 2015.
- AKALIN, A. S. Dairy-derived antimicrobial peptides: Action mechanisms, pharmaceutical uses and production proposals. *Trends in Food Science & Technology*, v. 36, p. 79-95. 2014.
- ALAMDARI, E. K; EHSANI, M. R. Antimicrobial Peptides Derived from Milk: A Review. *Journal of Food Biosciences and Technology*, v. 7, n. 1, p. 49-56. 2017.
- ARRUDA, M. S. et al. New peptides obtained by hydrolysis of caseins from bovine milk by protease extracted from the latex *Jacaratia corumbensis*. *LWT - Food Science and Technology*, v. 49, p. 73-79. 2012.
- BADOEI-DALFARD, A.; KARAMI, Z. Screening and isolation of an organic solvent tolerant-protease from *Bacillus* sp. JER02: Activity optimization by Response Surface Methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 89, p. 15-23. 2013.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Oxidative Stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123. 2006.
- BARRET, A. J. Classification of peptidases. *Methods in Enzymology*, v. 244, p. 1-15. 1994.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. 'Species' of peptidases. *Biological Chemistry*, v. 388, p. 1151-1157. 2007.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial Peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature*, v. 3, p. 238-250. 2005.
- BURG, B. V. D. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, p. 213-218. 2003.
- CARVALHO, T. et al. Produção de enzimas hidrolíticas por fermentação em estado sólido da palma doce (*Nopalea coccinellifera*) utilizando modelos estatísticos significativos. *Revista de estudos ambientais*, v.14, n.3, p.48-57. 2012.
- CAVICCHIOLI, R. et al. Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. *Microbial Biotechnology*, v. 4, n. 4, p. 449-460. 2011.
- CAVICCHIOLI, R. et al. Low-temperature extremophiles and their applications. *Current*

- Opinion in Biotechnology, v. 13, p. 253-261. 2002.
- CAVICCHIOLI, R. Microbial ecology of Antarctic aquatic systems. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, p. 691-706. 2015.
- CHAUD, L. C. S. et al. Considerações sobre a produção microbiana e aplicações de proteases. *Nucleus*, v. 4. n. 1-2 , p. 87-97. 2007.
- CHEUNG, L. K. Y. et al. 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.
- CHOWN, S. L. et al. The changing form of Antarctic biodiversity. *Nature*, v. 522, p. 431-438. 2015.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, v. 11, n. 7, p. 254-262. 2000.
- CORRÊA, A. P. F. et al. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 91, n. 12, p. 2247-2254. 2011.
- CORRÊA, A. P. F. 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.
- COTÂRLET, M. et al. Partial characterization of cold active amylases and proteases of *Streptomyces* sp. from Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 868-877. 2011.
- D'AMICO, S. et al. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Reports*, v. 7, p. 385-389. 2006.
- DALMASO, G. Z. L. et al. Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications. *Marine Drugs*, v. 13, p. 1925-1965. 2015.
- DANQUAH, M. K.; AGYEI, D. Pharmaceutical applications of bioactive peptides. *OA Biotechnology*, v.1, n. 2, p. 1-7. 2012.
- DEVINE, D. A.; HANCOCK, R. E. W. Cationic Peptides: distribution and mechanisms of resistance. *Current Pharmaceutical Design*, v. 8, p. 703-714. 2002.
- DEY, A. et al. Production, partial purification and characterization of an extracellular psychrotrophic lipase from *Pseudomonas* sp. ADT3. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, v. 5, n. 6, p. 1-8. 2014.
- DUARTE, A. W. F. et al. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. *Extremophiles*, v. 17, p. 1023-1035. 2013.

- EL-MOSTAFA, K. et al. Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*, v. 19, p. 14879-14901. 2014.
- ESPEJO-CARPIO, F. J. et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. *International Dairy Journal*, v. 32, p. 175-183. 2013.
- FERRÉS, I. et al. Identification of Antarctic culturable bacteria able to produce diverse enzymes of potential biotechnological interest. *Advances in Polar Science*, v. 26, n. 1, p. 71-79. 2015.
- FONTOURA, R. et al. Production of feather hydrolysates with antioxidant, angiotensin-I converting enzyme- and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activities. *New Biotechnology*, v. 31, n. 5, p. 506-513. 2014.
- FOX, P. F. Milk proteins as food ingredients. *International Journal of Dairy Technology*, v. 54, n. 2, p. 41-55. 2001.
- FOX, P. F. Milk: an overview. In: THOMPSON, A.; BOLAND, M.; SINGH, H. *Milk Proteins - From Expression to Food*. Burlington: Elsevier Inc., 2009. p. 1-44.
- FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, v. 18, p. 677-684. 2008.
- GIANOTTI, A. Produção recombinante e estudos funcionais de três novas cistatinas da cana-de-açúcar e sua utilização em estudos de inibição da adesão, proliferação, migração e invasão celular. São Carlos, SP: UFSC. Originalmente apresentada como tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos, 2008.
- GOBBA, C. et al. Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolysed by two commercial proteases. *International Dairy Journal*, v. 39, p. 28-40. 2014.
- GOMES, J. E. G. et al. Production, characterization and evaluation of in vitro digestion of phytases, xylanases and cellulases for feed industry. *African Journal of Microbiology Research*, v. 8, n. 6, p. 551-558. 2014.
- GOMES, J.; STEINER, W. Extremophiles and extremozymes. *Food Technology and Biotechnology*, v. 42, n. 4, p. 223-235. 2004.
- HAFEEZ, Z. et al. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Research International*, v. 63, p. 71-80. 2014.
- HAMID, B. et al. Psychrophilic yeasts and their biotechnological applications - A review. *African Journal of Biotechnology*, v. 13, n. 22, p. 2188-2197. 2014.
- HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-

infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, v. 24, n. 12, p. 1551-1557. 2006.

HIDALGO, M. E. et al. Biological and physicochemical properties of bovine sodium caseinate hydrolysates obtained by a bacterial protease preparation. *Food Hydrocolloids*, v. 43, p. 510-520. 2015.

IRWIN, J. A. et al. Purification and characterisation of a serine peptidase from the marine psychrophile strain PA-43. *FEMS Microbiology Letters*, v. 201, p. 285-290. 2001.

JÄKÄLÄ, P.; VAPAATALO, H. Antihypertensive Peptides from Milk Proteins. *Pharmaceuticals*, v. 3, p. 251-272. 2010.

JORGE, A. J. et al. The optimization of phenolic compounds extraction from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) skin in a reflux system using response surface methodology. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 3, p. 436-442. 2013.

JØRGENSEN, B. B.; BOETIUS, A. Feast and famine - microbial life in the deep-sea bed. *Nature Reviews Microbiology*, v.5, p.770-781. 2007.

JOSHI, S.; SATYANARAYANA, T. Biotechnology of cold-active proteases. *Biology*, v. 2, p. 755-783. 2013.

KARAN, R. et al. A novel organic solvent tolerant protease from a newly isolated *Geomicrobium* sp. EMB2 (MTCC 10310): Production optimization by response surface methodology. *New Biotechnology*, v. 28, n. 2, p. 136-145. 2011.

KETNAWA, S. et al. Gelatin hydrolysates from farmed Giant catfish skin using alkaline proteases and its antioxidative function of simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chemistry*, v. 192, p. 34-42. 2016.

KIRCHMAN, D. L. et al. Microbial growth in the polar oceans - role of temperature and potential impact of climate change. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, p. 451-459. 2009.

KITTS, D. D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, v. 9, p. 1309-1323. 2003.

KORHONEN, H. J. Bioactive components in bovine milk. In: PARK, Y. W. Bioactive components milk and dairy products. Iowa: Wiley-Blackwell, p. 15-42. 2009.

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

KRÜGER, C. C. H.; CÂNDIDO, L. M. B. Caseinofosfopeptídeos: obtenção e atividade biológica. *Alimentos e Nutrição*, v.20, n.1, p. 167-173. 2009.

KRUIF, C. G. et al. Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and*

Interface Science, v. 171-172, p. 36-52. 2012.

KUMAR, D. et al. Enzymatic hydrolysis of camel milk casein and its antioxidant properties. Dairy Science & Technology, v. 96, n. 3, p. 391-404. 2016.

LARIO, L. D. et al. Production, purification, and characterization of an extracellular acid protease from the marine Antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. Fungal Biology, v. 119, p. 1129-1136. 2015.

LI, J. et al. Purification and characterization of cold-adapted beta-agarase from an Antarctic psychrophilic strain. Brazilian Journal of Microbiology, v. 46, n. 3, p. 683-690. 2015.

LIMA, C. A. et al. Antimicrobial and radical scavenging properties of bovine collagen hydrolysates produced by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 collagenase. Journal of Food Science and Technology, v. 52, n. 7, p. 4459-4466. 2015.

LIRA, T. B. F. et al. Avaliação de variáveis que influenciam a hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra Moxotó. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 45, n.9, p.1036-1043. 2010.

LUO, Y. et al. Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: Partial characterizations. Food Chemistry, v. 155, p. 146-154. 2014.

MACHADO, A. et al. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 781-789. 2004.

MACIEL, M. D. C. et al. Production and partial characterization of pectinases from forage palm by *Aspergillus niger* URM 4645. African Journal of Biotechnology, v. 10, n. 13, p. 2469-2475. 2011.

MADIGAN, M. T. et al. Microbiologia de Brock. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MARGESIN, R.; MITEVA, V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. Research in Microbiology, v. 162, p. 346-361. 2011.

MAURER, K. H. Detergent proteases. Current Opinion in Biotechnology, v.15, p. 330-334. 2004.

MEISEL, H. Multifunctional peptides encrypted in Milk proteins. BioFactors, v. 21, p. 55–61. 2004.

NASCIMENTO, T. C. E. S. et al. Extracellular serine proteases by *Acremonium* sp. L1-4B isolated from Antarctica: Overproduction using cactus pear extract with response surface methodology. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 4, n. 737-744. 2015.

NEITZEL, J. J. Enzyme catalysis: The serine proteases. Nature Education, v. 3, n. 21. 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. 3ª ed. New York: Worth. Publishers. 2000. 1255 p.

- NEURATH, H. et al. Evolution of structure and function of proteases. *Science*, v. 158, n. 3809, p. 1638-1644. 1967.
- NUNES, C. S. Usos e aplicações da palma forrageira como uma grande fonte de economia para o semiárido nordestino. *Revista Verde*, v.6, n.1, p. 58-66. 2011.
- OLIVEIRA, C. F. et al. Soy protein hydrolysis with microbial protease to improve antioxidant and functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, v. 52, n. 5, p. 2668-2678. 2015.
- OSKOUIE, S. F. G. et al. Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 393, p. 7-42. 2008.
- PARK, Y. W. Bioactive components in goat milk. In: PARK, Y.W. Bioactive components milk and dairy products. Iowa: Wiley-Blackwell, 2009. p. 43-81.
- PARK, Y. W. et al. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, v. 68, p. 88–113. 2007.
- QOURA, F. et al. Purification and characterization of a cold-adapted pullulanase from a psychrophilic bacterial isolate. *Extremophiles*, v. 18, n. 6, p. 1095-1102. 2014.
- RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, p. 597-635. 1998.
- RASMUSSEN, L. K. et al. Disulphide-linked caseins and casein micelles. *International Dairy Journal*, v. 9, p. 215-218. 1999.
- ROLLEMA, H. S. Casein association and micelle formation. In: FOX, P. F. Advanced dairy chemistry - 1: Proteins. London: Elsevier Applied Science, 1992. p. 111-140.
- ROMAN, J. A.; SGARBIER, V. C. Efeito da hidrólise enzimática sobre propriedades funcionais de caseína bovina coagulada pela ação da quimosina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 3, p. 468-474. 2005.
- SÁENZ, C. et al. Opuntia spp. mucilage's a functional component with industrial perspectives. *Journal of Arid Environments*, v. 57, p. 275–290. 2004.
- SAIGA, A. et al. Antioxidant Activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 3661-3667. 2003.
- SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, v. 3, p. 229-254. 2011.
- SANTANA, R. S. M. et al. Produção de amiloglucosidase utilizando como substrato a palma

forrageira. Revista Caatinga, v. 25, n. 1, p. 188-193. 2012.

SGARBIERI, V. C. Review: Structural and physicochemical properties of milk proteins. Brazilian Journal of Food Technology, v.8, n.1, p. 43-56. 2005.

SIDDIQUI, K. S. CAVICCHIOLI, R. Cold-adapted enzymes. Annual Review of Biochemistry, v. 75, p. 403-433. 2006.

SINGH, G. et al. Extremophiles and extremozymes: Importance in current biotechnology. ELBA Bioflux, v. 3, n. 1, p. 46-54. 2011.

SOUZA, P. M. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. Brazilian Journal of Microbiology, v. 46, n. 2, p. 337-346. 2015.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 90, p. 1-11. 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

TREMACOLDI, C. R. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. Documentos 353 / Embrapa Amazônia Oriental. Belém: Embrapa Amazônia, 2009. p. 0-44.

TROPEANO, M. et al. Extracellular hydrolytic enzyme production by proteolytic bacteria from the Antarctic. Polish Polar Research, v. 34, n. 3, p. 253-267. 2013.

VAZ, A. B. M. et al. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. Brazilian Journal of Microbiology, v. 42, p. 937-947. 2011.

VÁZQUEZ, S. C. et al. Extracellular proteases from the Antarctic marine *Pseudoalteromonas* sp. P96-47 strain. Revista Argentina de Microbiología, v. 40, n. 63-71. 2008.

VITOLO, M. Enzimas e aplicações. In: VITOLO, M.; PESSOA-JUNIOR, A.; SOUZA, G. M.; CARVALHO, J. C. M.; STEPHANO, M. A.; SATO, S. Biotecnologia farmacêutica: aspectos sobre aplicação industrial. São Paulo: Blucher, 2015. p. 247-287.

WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist? International Dairy Journal, v. 9, p. 189-192. 1999.

WANG, G. et al. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. Nucleic Acids Research, v. 37, p. 933-937. 2009.

WANG, G. et al. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. Nucleic Acids Research, v. 44, p. 1087-1093. 2016.

WANG, Q. F. et al. Purification and properties of an extracellular cold-active protease from the psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. NJ276. Biochemical Engineering Journal,

v.38, p. 362-368. 2008.

WANG, Z.; WANG, G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Research*, v. 32, p. 590-592. 2004.

YAMADA, A. et al. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from bovine casein. *Food Chemistry*, v. 141, p. 3781–3789. 2013.

YU, Y. et al. Bacterial diversity and bioprospecting for cold-active hydrolytic enzymes from culturable bacteria associated with sediment from Nella Fjord, Eastern Antarctica. *Marine Drugs*, v. 9, p. 184-195. 2011.

ZAMBARE, V. et al. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: Enzyme production and its partial characterization. *New Biotechnology*, v. 28, p. 173-181. 2011.

ZENG, R. et al. Cold-active serine alkaline protease from the psychrophilic bacterium *Pseudomonas* strain DY-A: enzyme purification and characterization. *Extremophiles*, v. 7, p. 335-337. 2003.

ZHANG, J. W.; ZENG, R. Y. Purification and characterization of a cold-adapted alpha-amylase produced by *Nocardiopsis* sp. 7326 isolated from Prydz Bay, Antarctic. *Marine Biotechnology*, v. 10, n. 1, p. 75-82. 2008.

ZHANG, Y. et al. Comparison of dipeptidyl peptidase IV-inhibitory activity of peptides from bovine and caprine milk casein by in silico and in vitro analyses. *International Dairy Journal*, v. 53, p. 37-44. 2016.

CAPÍTULO I

**Serino protease extracelular por *Acremonium* sp. L1-4B isolado na Antártica:
Superprodução utilizando extrato de palma com metodologia de superfície de resposta**

Publicado na revista:



ISSN: 1878-8181

Ano: 2015

Número: 4

Páginas: 737 à 744

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.10.006i>

Guia para autores disponível em:

<https://www.elsevier.com/journals/biocatalysis-and-agricultural-biotechnology/1878-8181/guide-for-authors>

**Serino protease extracelular por *Acremonium* sp. L1-4B isolado na Antártica:
Superprodução utilizando extrato de palma com metodologia de superfície de resposta**

Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento¹; Amanda Reges de Sena²; José Erick Galindo Gomes³; Wellington Leal dos Santos⁴; Gualberto Segundo Agamez Montalvo⁵; Elias Basile Tambourgi⁶; Erika Valente de Medeiros⁴; Lara Durães Sette⁷; Adalberto Pessoa Junior⁸; Keila Aparecida Moreira^{4*}

¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Pernambuco, Brasil. E-mail: talitacamila07@gmail.com

²Laboratório de Microbiologia Aplicada, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco. Pernambuco, Brasil. E-mail: amandareges@gmail.com

³Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Universidade do estado de São Paulo. São Paulo, Brasil. E-mail: erick.galindo.zoo@hotmail.com

⁴Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Pernambuco, Brasil. E-mail: wellingtonleal16@gmail.com; evmbio@gmail.com.

⁵Instituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo, São Paulo. Brasil. E-mail: gsagamez@gmail.com

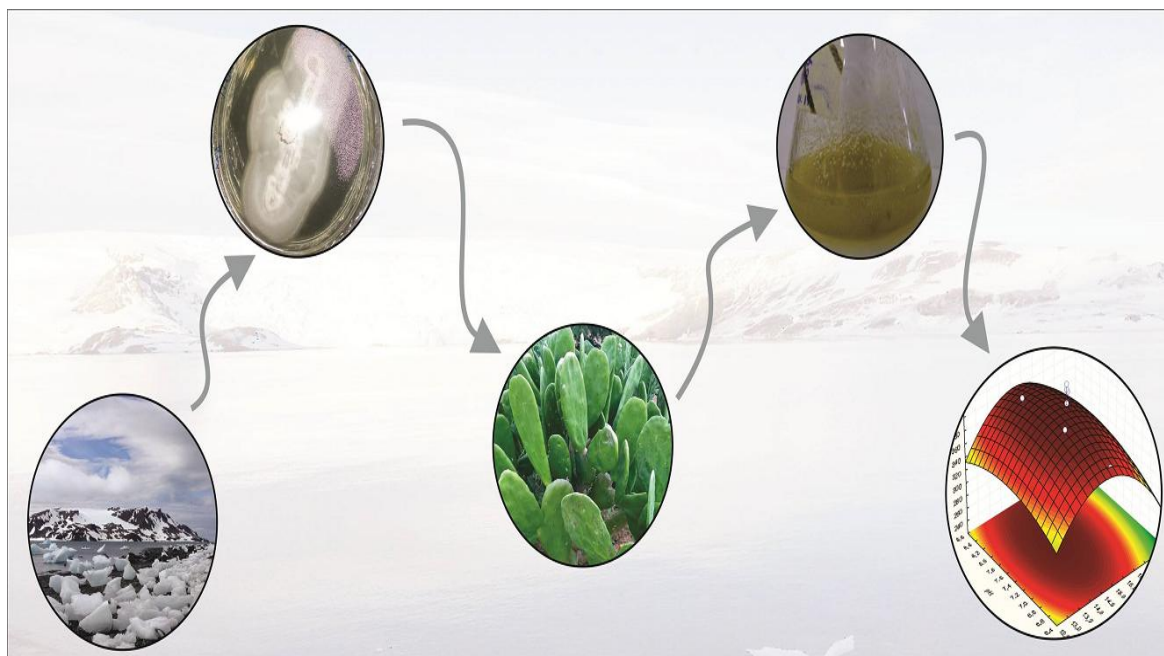
⁶Departamento de Engenharia Química de Sistemas, Universidade de Campinas. São Paulo, Brasil. E-mail: eliastam@feq.unicamp.br

⁷Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Universidade do Estado de São Paulo. São Paulo, Brasil. E-mail: larasette@rc.unesp.br

⁸Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil. E-mail: peessoajr@usp.br

***Autor de Correspondência:** moreirakeila@hotmail.com / Tel: +55 (87) 37645520 ou +55 (87) 92433912.

Resumo gráfico



Destaques

Proposta de método atrativo para biotransformação de palma.

Viabilidade do uso de produtos da agricultura em bioprocessos.

Proteases ativas ao frio secretadas por fungo filamentoso isolado na Antártica.

Biocatalisador tolerante a diferentes surfactantes e concentrações de NaCl.

Serino protease estável em toda faixa de pH avaliado.

**Serino protease extracelular por *Acremonium* sp. L1-4B isolado na Antártica:
Superprodução utilizando extrato de palma com metodologia de superfície de resposta**

Resumo

Acremonium sp. L1-4B, isolado de líquen na Antártica foi utilizado para produzir protease extracelular por fermentação submersa empregando extrato de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill). Um planejamento fatorial 2^3 foi aplicado para aumentar a produção de proteases usando três variáveis independentes, nomeadamente temperatura, pH e concentração de extrato de levedura, também foi utilizado um Delineamento Composto Central (DCC) dentro da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Todas as variáveis e interações analisadas no planejamento fatorial foram significativas ou marginalmente significantes, o delineamento composto central foi desenvolvido, e a metodologia de superfície de resposta foi estabelecida em direção ao ponto mais alto. O modelo experimental foi validado sob condições de 14 °C, pH 7,54, acrescido de 0,55% de extrato de levedura, apresentando atividade proteásica de $447,65 \pm 2,6$ U/mL mediante a previsão do modelo de 445,48 U/mL. A enzima apresentou massa molar de 59 kDa; foi inibida na presença de PMSF (serino protease); apresentou condições ótimas em pH 8,0 e a 50 °C; permaneceu estável na faixa de pH 3,0 a 9,0 e entre 10 e 40 °C; demonstrou tolerância a 3000mM de NaCl, do mesmo modo a surfactantes, peróxido de hidrogênio e ureia a 5%. O trabalho apresenta uma proposta de metodologia de produção economicamente atrativa ao utilizar a palma forrageira como fonte prioritária de carbono. Além disto, a protease secretada por *Acremonium* sp. L1-4B apresentou uma combinação de características bioquímicas que confere promissora variabilidade de aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Fungo filamentoso, Micro-organismo psicrófilo, Cacto, Otimização, Bioconversão.

**Extracellular serine proteases by *Acremonium* sp. L1-4B isolated from Antarctica:
Overproduction using cactus pear extract with response surface methodology**

Abstract

Acremonium sp. L1-4B isolated from lichen in Antarctica was used to produce extracellular proteases through submerged fermentation using cactus pear extract (*Opuntia ficus-indica* Mill). A 2^3 factorial design was applied to optimize the protease production using three independent variables, namely temperature, pH and concentration of yeast extract, was also used a Central Composite Design (CCD) under Response Surface Methodology (RSM). All variables and interactions analyzed in the factorial design were significant or marginally significant, a Central Composite Design was developed, and the Response Surface Methodology towards the highest point it was established. The experimental model was validated under 14°C, pH 7.54, and 0.55% yeast extract, showing a protease activity of 447.65 ± 2.6 U/mL by a prediction model of 445.48 U/mL. The enzyme showed a molecular weight of 59 kDa; it was inhibited in the presence of PMSF (serine protease); it presented optimal conditions at pH 8.0 and 50°C; it remained stable at pH in the 3.0-9.0 range and between 10 and 40°C; it showed a tolerance to 3000 mM NaCl as well as to surfactants, hydrogen peroxide and urea at 5%. This paper presents a proposal for an economically attractive production methodology using cactus pear as a primary source of carbon. In addition, the protease secreted by *Acremonium* sp. L1-4B presented a combination of biochemical characteristics that grants a promising variability of biotechnological applications.

Keywords: Filamentous fungus, Psychrophilic microorganisms, Cactus, Optimization, Bioconversion

INTRODUÇÃO

Micro-organismos extremófilos tem estrutura molecular adaptada para o desenvolvimento e propagação em ambientes hostis, comumente estão sujeitos a várias condições de estresse, como altas ou baixas temperaturas, extremas condições de pH, diferenciadas concentrações de sais, elevados níveis de radiação e pressão, restrição hídrica e nutritiva (GOMES; STEINER, 2004).

Enzimas sintetizadas por micro-organismos psicrófilos desenvolveram uma gama de características estruturais, que lhes conferem um elevado grau de flexibilidade e atividade específica elevada em temperaturas baixas, de modo que, estes biocatalisadores têm atraído grande atenção com aplicações que visam diminuir o consumo de energia (JOSHI; SATYANARAYANA, 2013; SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006).

A secreção de enzimas por micro-organismos é afetada geralmente por condições físico-químicas e nutricionais. O processo de avaliação dos componentes do meio e otimização de parâmetros como pH e temperatura representa etapa crucial para produção enzimática na prática comercial. Todavia, para analisar a influência destes elementos comumente tem sido usada a metodologia de superfície de resposta (FLEURI; SATO, 2008; JOSHI; SATYANARAYANA, 2013).

O emprego de produtos agrícolas e resíduos agroindustriais em bioprocessos tem apresentado relevante viabilidade produtiva para obtenção de enzimas com interesse industrial e econômico. Castro; Sato (2013) sugerem a combinação de resíduos no processo fermentativo para obtenção sinérgica de enzimas como protease e α -amilase. Maciel et al. (2011) utilizaram palma forrageira como substrato na fermentação sólida e produziram enzimas do complexo pectinolítico por *Aspergillus niger*. Em fermentação submersa, Gomes et al. (2014) utilizaram meio composto por palma, entrecasca de mandioca e água de

maceração de milho e obtiveram produção significativa de celulases, fitases e xilanases a partir de *Aspergillus tamarii*.

A palma (*Opuntia ficus-indica* Mill) é uma cactácea cultivada amplamente na região nordeste do Brasil, apresenta moderado valor nutricional, é empregada em larga escala como forragem para rebanhos ruminantes e de forma menos significativa na alimentação humana (BEZERRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2011). O gênero *Opuntia* é conhecido como produtor de mucilagem, um carboidrato complexo com excelente capacidade de absorção hídrica (SÁENZ et al., 2004).

Com objetivo de estabelecer parâmetros para produção de proteases através de um fungo filamentoso isolado da Antártica, foram empregados modelos experimentais para viabilizar o uso da palma forrageira como substrato majoritário no processo fermentativo, e consequentemente, detectar as características bioquímicas da enzima obtida no estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo e inóculo

Neste estudo, foi empregado o fungo filamentoso *Acremonium* sp. L1-4B isolado de amostra de líquen no continente Antártico, o qual se encontra preservado na coleção de pesquisa associada à Coleção Brasileira de Micro-organismo de Ambiente e Indústria (CBMAI). A linhagem foi reativada em meio de cultivo Batata Dextrose Ágar, na temperatura de 15 °C por 360 horas. O inóculo foi padronizado em solução de NaCl (0,3%) e Tween 80 (0,1%) contendo 10^6 conídios por mL.

Produção de proteases

A produção de proteases ocorreu com utilização da palma como principal fonte de carbono. Os cladódios da palma foram obtidos na cidade de Garanhuns-PE, região Nordeste do Brasil, submetidos a um processo de higienização com hipoclorito de sódio 2% por 20 segundos, em seguida duas lavagens com água destilada. O processamento do cladódio foi em

processador e o extrato de palma obtido foi diluído na proporção 1:5 (v/v) com H₂O deionizada e estocado a -20 °C. A relação carbono-nitrogênio do meio validado foi igual a 5,54 g (g carbono/ g nitrogênio). Todos os ensaios de produção foram conduzidos em frascos tipo Erlenmeyer com capacidade de 125 mL contendo 25 mL de meio de cultivo, composto por extrato de palma associado a diferentes concentrações de extrato de levedura, pH e temperatura descritos no planejamento experimental. A fermentação em incubadora refrigerada (Modelo TE-422, TECNAL, Piracicaba, Brasil) transcorreu por 96 horas, sob agitação orbital a 120 rpm.

Avaliação da influência de diferentes fatores na produção enzimática empregando planejamento estatístico fatorial 2³

Foi utilizado um planejamento fatorial 2³ com três pontos centrais, totalizando 11 ensaios, com a finalidade de verificar fatores ou variáveis independentes que influenciam significativamente a produção da enzima. No planejamento foi avaliada a concentração de extrato de levedura, a temperatura e o pH na produção de proteases.

Otimização da produção através do Delineamento Composto Central

O DCC foi utilizado para determinar as melhores condições para a produção enzimática. O delineamento continha três variáveis, seis pontos axiais e quatro pontos centrais, totalizando em 18 ensaios. Todas as variáveis foram estudadas em cinco níveis (- α , -1, 0, 1, α). Com o intuito de prever a produção da enzima nas condições das variáveis significativas, foi aplicada a Metodologia de Superfície de Resposta (Tabela 1).

O comportamento do sistema foi explicado pela equação quadrática (Equação 1).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{11} A^2 + \beta_{22} B^2 + \beta_{33} C^2 + \beta_{12} AB + \beta_{13} AC + \beta_{23} BC + \varepsilon$$

(Equação 1).

Onde Y é a resposta experimental, β_0 é o intercepto, β_1 , β_2 e β_3 são os coeficientes lineares, β_{11} , β_{22} e β_{33} os coeficientes quadráticos, β_{12} , β_{13} e β_{23} coeficientes de interação e A , B , C , A^2 , B^2 , C^2 , AB , AC e BC as variáveis independentes, e ε o erro experimental.

Validação do modelo estatístico

Para validar a composição do meio, três experimentos adicionais foram realizados nas condições previstas para produção enzimática. A atividade proteásica no extrato enzimático foi utilizada como variável dependente no estudo comparativo.

Análises estatísticas

Os resultados obtidos no planejamento fatorial 2^3 e no delineamento composto central foram processadas no software Statistica 8.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, EUA), para indicar os efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ou marginalmente significativos ($p < 0,1$), e o ajuste do modelo aos dados experimentais. Todos os experimentos foram realizados aleatoriamente.

Atividade proteásica

A atividade proteásica foi determinada utilizando azocaseína (Sigma Aldrich; St. Louis, MO, EUA) como substrato, de acordo com o método descrito por Charney; Tomarelli (1947), com modificações. A mistura reacional contendo 0,5 mL de azocaseína 0,5% (m/v) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, e 0,5 mL de extrato enzimático foi incubada a 37 °C por 40 minutos, posteriormente interrompida por adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético 10%, centrifugada (4000 x g) por 10 minutos a 4 °C (MIKRO 200 R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Alemanha). Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada em 0,5 mL de hidróxido de potássio 500 mM. Uma unidade de protease foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir aumento na absorbância de 0,001 por minuto de reação no comprimento de onda de 430 nm (Espectrofotômetro UV - Visível, - Libra S22, Biochrom, Cambridge, Inglaterra).

Propriedades bioquímicas da protease produzida por Acremonium sp. L1-4B

O extrato enzimático bruto resultante do teste de validação estatística foi submetido ao estudo de caracterização bioquímica.

Temperatura e pH ótimo

Para determinação da temperatura ótima da protease, o extrato enzimático foi incubado na faixa de 10 a 80 °C. O pH ótimo da enzima foi determinado empregando os tampões: citrato de sódio (pH 3,0; 4,0), acetato de sódio (pH 5,0), fosfato de sódio (pH 6,0; 7,0), Tris-HCl (8,0; 9,0) a 50 mM. Os resultados da temperatura e pH ótimos foram expressos em atividade relativa (%).

Estabilidade a temperatura e ao pH

A estabilidade térmica e ao pH foram avaliadas incubando-se o extrato enzimático durante 180 minutos, nas mesmas condições de temperatura e pH descritos no ensaio anterior. Expresso em atividade residual (%).

Efeito do NaCl na reação catalítica

Para determinar o efeito do NaCl na atividade proteásica, o substrato azocaseína foi preparado com diferentes concentrações de NaCl (0-3000 mM), os resultados expressos em atividade relativa (%).

Efeito de surfactantes e outras substâncias na atividade enzimática

Foram avaliados os seguintes componentes: surfactantes Triton X-100 (5%), Tween 20 (5%); Tween 80 (5%); Polietileno glicol 2000 (5%). Desnaturante químico ureia (5%), o agente branqueador H₂O₂ (5%), e o redutor β-mercaptoethanol (1 e 5 mM). O extrato enzimático foi previamente incubado por 30 minutos a 26±2 °C com a substância avaliada. A atividade relativa foi determinada utilizando como controle o extrato enzimático sem adição de agentes.

Efeito de inibidores de proteases

O efeito de diferentes inibidores como ácido iodoacético (1 e 10 mM); fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF; 1 e 10 mM); pepstatina A (1 mM), e etilenodiamino tetra-acético (EDTA; 1 e 10 mM) foram avaliados. O extrato enzimático foi incubado durante 30 minutos com o inibidor e subsequentemente uma alíquota retirada, e submetida à detecção da atividade enzimática. Os resultados foram calculados em relação ao controle sem inibidor.

Determinação da massa molar e zimografia

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), foi realizada segundo o método descrito por Laemmli (1970), utilizando gel de empilhamento a 4% e de resolução a 13,75%, padrão de massa molar GE Healthcare (LMW Calibration Kit For SDS Electrophoresis - Amersham Place, Buckinghamshire, Inglaterra), composto por fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa). A corrida transcorreu a 4 °C, 284 V, 25 mA, 7 W, durante 81 minutos. O gel foi corado em solução contendo *Comassie Brilliant Blue* por 120 minutos, após, foi descorado em solução contendo metanol, água e ácido acético por 24 horas. Foi contracorado em coloração de prata GE Healthcare (PlusOne, Silver Staining kit, Protein, Uppsala, Suécia). A massa molar foi estimada através da análise de imagens pelo software LabImage 1D (Loccus, Cotia, São Paulo, Brasil). A zimografia foi realizada segundo Egito et al. (2007), com modificações, utilizando como substrato gelatina (0,2 mg/mL), a corrida foi realizada a 4 °C, 320 V, 50 mA, 16 W, durante 62 minutos. O gel foi incubado em solução de Triton X-100 2,5% por 20 minutos a 4 °C, posteriormente foram efetuadas três lavagens com água e incubado em tampão Tris-HCl 50 Mm, pH 7,5, contendo CaCl_2 15 Mm por 120 minutos a 37 °C. O gel foi corado e descorado com as mesmas soluções usadas na eletroforese, entretanto, a descoloração só ocorreu após visualização de uma zona de hidrólise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da influência de diferentes fatores na produção enzimática empregando planejamento fatorial 2^3

Os dados resultantes do planejamento fatorial 2^3 apresentaram variação da atividade proteásica secretada por *Acremonium* sp. L1-4B entre 0,07 a 191,32 U/mL, indicando a importância e necessidade de utilizar planejamentos experimentais com a finalidade de atingir rendimentos mais elevados na produção enzimática. Neste delineamento, a diferença entre o menor e o maior resultado (ensaios 6 e 3, respectivamente) exibiu aumento de 2,73 vezes na variável resposta, de modo a prever que, os parâmetros de composição do ensaio 3 possivelmente proporcionam melhores condições de estímulo para expressão e consequentemente produção extracelular da protease por *Acremonium* sp. L1-4B (Tabela 2).

Os resultados obtidos pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 3), revelaram que a regressão foi estatisticamente significativa, enquanto a falta de ajuste não foi. O ajuste do modelo foi mensurado pelo coeficiente de determinação (R)², que teve um valor de **0,9333** e $R^2_{adj} = 0,8334$, indicando que **93,33%** da variação total da atividade foram explicadas pelo modelo ajustado.

Verificou-se que todas as variáveis independentes e suas interações foram significativas ($p < 0,05$), ou marginalmente significante ($p < 0,10$) (Tabela 4). Os fatores temperatura e extrato de levedura (ambos significativos) tiveram efeitos negativos, indicando que, quando houve um aumento da temperatura de 15 para 25 °C e da concentração de extrato de levedura de 0,5% a 1,5%, resultou na diminuição na produção da protease. Como o pH foi marginalmente significativo e suas interações foram significativas, determinou-se continuar na direção do efeito de interação de maior magnitude (Tabela 4).

No trabalho de Badoei-Dalfard; Karami (2013), os autores encontraram que a temperatura, pH, $MgSO_4$ e NaCl foram as variáveis que mais influenciaram na produção de

proteases por *Bacillus* sp. usando um planejamento Plackett-Burman, sendo elas estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Na produção de protease alcalina por *Marinobacter* sp. GA CAS9, os autores relataram que a produção da enzima foi fortemente influenciada pela concentração de NaCl, extrato de carne, CuSO₄, temperatura de incubação e os valores iniciais de pH, obtendo valores entre 298,15 e 487,24 U mL⁻¹, uma vez que os parâmetros restantes (lactose, CuSO₄ e tempo de incubação) foram idênticos nestes dois extremos de atividade, no entanto, o pH teve um efeito positivo, e temperatura e a concentração de NaCl teve efeitos negativos (KUMAR et al., 2014). Tendo em vista que os estudos descritos anteriormente relacionados à produção de proteases foram fortemente influenciados por parâmetros físico-químicos no cultivo, além do que, empregando diferentes micro-organismos, só reforça a importância do uso de ferramentas estatísticas para a modelagem do projeto experimental.

Otimização da produção de protease utilizando Delineamento Composto Central

Uma nova matriz experimental foi construída com a finalidade de aumentar a produção de protease por *Acremonium* sp. L1-4B, todas as variáveis foram avaliadas em cinco níveis, sendo eles temperatura (13, 14, 15, 16 e 17 °C), pH (6,5, 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5) e a concentração de extrato de levedura (0,0, 0,2, 0,4, 0,6 e 0,8% m/v). Os níveis destes fatores foram apresentados na Tabela 5, junto com os resultados experimentais e os previstos obtidos do modelo ajustado.

Os efeitos das variáveis foram estimados e apresentados na Tabela 6. A temperatura, pH e extrato de levedura nos termos quadráticos, tiveram efeito negativo, indicando uma região de valores máximos de produção no ponto central ou perto dele. Um aumento do pH (de 6,5 para 8,0) e da concentração de extrato de levedura (0-0,8%) determinou uma maior produção de protease, em média de 3,08 e 148,80 U/mL, respectivamente. Em termos linear, o efeito do pH não foi significativo, a temperatura foi marginalmente significativa ($p <$

0,10), e o único efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) foi do extrato de levedura. Sendo esta a variável com maior influência na produção da enzima no campo experimental estudado.

Mediante isso, Kammoun et al. (2008), relataram que o uso de fontes de nitrogênio orgânicas pode ter um efeito significativo sobre a produção de enzimas, uma vez que ela pode ter uma porcentagem de minerais naturais e de carbono na sua composição.

Uma análise de regressão múltipla, baseado no método de mínimos quadrados foi realizada utilizando o programa Statistica, versão 8.0. Na Eq. (2) pode ser observado que a atividade enzimática segue um modelo polinomial de segunda ordem com 10 coeficientes.

Atividade enzimática (U/mL) =

$$\begin{aligned} & - 7941,71 (\pm 2170,094) + 721,02 \cdot T (\pm 170,102) - 24,00 \cdot T^2 (\pm 4,786) + \\ & 707,42 \cdot pH (\pm 340,205) - 48,06 \cdot pH^2 (\pm 19,146) + 1754,53 \cdot EL (\pm 645,914) - \\ & 566,22 \cdot EL^2 (\pm 119,659) + 1,95 \cdot T \cdot pH (\pm 12,037) - 67,31 \cdot T \cdot EL (\pm 30,093) - \\ & 20,62 \cdot pH \cdot EL (\pm 60,186) \end{aligned}$$

(Equação 2)

Onde T é temperatura ($^{\circ}\text{C}$), EL é a concentração de extrato de levedura (%) e pH é o potencial hidrogeniônico.

A Tabela 7 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o modelo de superfície de resposta da equação 2.

O teste *Fisher-based* (teste F) indicou o ajuste de Equação 2 foi estatisticamente significativa ($F_{cal} > F_{tab}$) e a falta de ajuste mostrou boa concordância ($F_{cal} < F_{tab}$) entre o modelo de resposta previsto e os valores experimentais. A qualidade do ajuste do modelo foi medida pelo coeficiente de determinação (R^2) **0,8709** e o $R^2_{Adj} = 0,7255$. Indicando que o modelo ajustado explicou **87,09%** da variação total na atividade residual.

Os valores otimizados foram calculados por sua diferenciação parcial no que diz respeito à temperatura, pH e extrato de levedura. Os gráficos de superfície de resposta Fig. 1 (A, B e C) foram desenhados para determinar os níveis ótimos das variáveis independentes de acordo com a Eq. (2). Cada superfície de resposta mostra o efeito de dois fatores, enquanto o terceiro foi fixado no seu ponto central.

O efeito relativo entre pH e temperatura na produção de protease é apresentado na Fig. 1 (A). A mudança da temperatura de 13 °C a 14 °C resultou no incremento da produção de enzima, em torno de 20,93 U/mL. Na Fig. 1 (B) observou-se o afastamento do ponto ótimo com a diminuição da concentração de extrato de levedura associado aos níveis de temperatura mais elevados do planejamento. Quando houve redução da concentração do extrato de levedura de 0,6% para 0,2%, foi observada diminuição da produção em torno de 34,32 U/mL. No entanto, no nível mais baixo de temperatura testada do planejamento DCC e acrescentando a concentração de extrato de levedura de 0,2% para 0,6%, aumentou a atividade proteásica de 365,85 para 436,50 U/mL. Indicando a presença de um efeito negativo de interação entre as duas variáveis na produção de protease (Tabelas 5 e 6).

Na Fig. 1 (C), o efeito da relação entre concentração de extrato de levedura e pH demonstrou que nas menores concentrações de extrato levedura entre 0,0-0,2%, a produção da enzima foi reduzida independente do pH testado. No entanto, observou-se que a secreção de proteases encontra sua região ótima entre 0,4% e 0,7% de extrato de levedura, e na faixa de pH 7,2 a 8,0.

Neste estudo o uso da metodologia de superfície de resposta permitiu guiar de uma forma confiável e eficiente os parâmetros que influenciaram diretamente na produção de proteases, corroborando com o relato de Mnif et al. (2012), que um dos dispositivos mais utilizados com a finalidade de proporcionar maior economia no bioprocessamento, é a

utilização da metodologia de superfície de resposta para a otimização dos componentes do meio.

Validação

Os resultados demonstraram um elevado grau de semelhança entre os dados simulados e experimentais. O modelo foi validado utilizando as variáveis independentes temperatura (14 °C), pH (7,54) e extrato de levedura (0,55%). A semelhança entre a atividade proteásica prevista (445,48 U/mL) e a resposta experimental ($447,65 \pm 2,6$ U/mL) definiu a validação. Neste estudo, foram utilizados dois métodos estatísticos, que permitiram aumentar a atividade enzimática em 2,35 vezes (134,94%) em condições ótimas, quando comparado com o melhor resultado obtido no planejamento experimental fatorial 2^3 . Shabbiri et al. (2012), utilizando DCC, obteve um aumento de 2,0 vezes na produção de protease por *Brevibacterium linens* DSM 20158. Meena et al. (2013), nas condições otimizadas utilizando a metodologia Taguchi, aumentaram a secreção da enzima por *Pseudomonas aeruginosa* em 1,29 (28,8%). Todavia, após encontrar a condição ideal para produzir proteases por *Exiguobacterium* sp. CFR26M utilizando um DCC, Kumar e Suresh, (2014), obtiveram um aumento de 6,30 vezes.

Propriedades bioquímicas da protease produzida por Acremonium sp. L1-4B

Temperatura e pH ótimo

A enzima exibiu maior atividade catalítica a 50 °C, entretanto, apresentou atividade relativa acima de 20% a 10 °C, e em torno de 17% a 80 °C (Fig. 2(A)). O ótimo da protease foi em pH 8,0, exibindo atividade relativa superior a 87% na faixa de pH 6,0 a 9,0 (Fig. 2(B)). Contudo, sofreu influência negativa frente pH 3,0 e 4,0, exibindo respectivamente 1 e 8,5% de atividade relativa nestas condições. A enzima apresentou características de ativação que sugere a alta flexibilidade da biomolécula, predisposta a catalisar em baixas e elevadas temperaturas. E maior eficiência na faixa neutra e alcalina de pH. Resultados similares foram encontrados por Irwin et al. (2001), avaliando uma protease secretada através da cepa

psicrófila marinha PA-43, que apresentou melhor atividade entre 55 e 60 °C e no pH 8,3. Todavia, a protease da bactéria isolada na Antártica *Pseudoalteromonas* sp. NJ276 exibiu seu ótimo na temperatura de 30 °C e pH 8,0. Muito embora os micro-organismos sejam provenientes de ambientes frios, características distintas possivelmente podem estar relacionadas com a variabilidade genética das cepas e a adaptação fisiológica das mesmas (WANG et al., 2008). Contudo, avaliando a protease de um fungo mesófilo, Abidi et al. (2011), verificaram que a enzima secretada por *Botrytis cinerea* apresentou características semelhantes com as encontradas neste estudo, temperatura ótima de 50 °C, e pH 8,0. Também estudando mesófilos, Savitha et al. (2011), observaram que proteases produzidas por *Graphium putredinis* demonstraram seu ótimo a 50 °C em pH 7,0, já a proteína secretada por *Trichoderma harzianum* exibiu maior atividade catalítica a 60 °C e no pH 8,0. De acordo com Shankar et al. (2011), o pH afeta a ionização de aminoácidos, que ditam a estrutura primária e secundária da enzima e a temperatura influencia diretamente na velocidade da reação enzimática. Esta afirmação corrobora com os resultados encontrados neste estudo, onde a temperatura teve inferência direta na ativação enzimática, e a acidificação provocou a inativação protéica, é possível que a estrutura da sua superfície tenha sofrido alterações, ocasionando a falta de interação entre o sítio catalítico da enzima e substrato.

Estabilidade a temperatura e ao pH

A protease secretada através do psicrófilo *Acremonium* sp. L1-4B demonstrou ser estável termicamente durante 180 minutos na faixa de temperatura de 10 a 40 °C, exibindo termolabilidade nas temperaturas superiores a 50 °C (Fig. 2(A)). Contudo, quando avaliada frente diferentes faixas de pH, a enzima evidenciou estabilidade, apresentou atividade residual acima de 87% em todas as faixas de pH testados ao perfazer 180 minutos de ensaio (Fig. 2(B)). Wang et al. (2008) verificaram que a protease da psicrófila *Pseudoalteromonas* sp. NJ276 manteve-se estável a 30 °C durante 50 minutos, quando incubada a 50 °C a enzima

perdeu 55% da sua atividade após 20 minutos, e foi completamente inativada com 30 minutos. Entretanto, demonstrou estabilidade na faixa de pH 7,0 a 9,0 durante 60 minutos. Vázquez et al. (2008), observaram que a enzima proveniente da bactéria Antártica *Pseudoalteromonas* sp. P96-47 exibiu termoestabilidade durante 60 minutos abaixo de 30 °C, todavia, foi inativada a 60 °C no mesmo intervalo de tempo. Exibiu maior estabilidade na faixa de pH neutro a alcalino, mantendo mais de 80% da atividade a pH 6 a 10 após 180 minutos de incubação a 4 °C. Já as proteases da mesófila *Bacillus subtilis* AP-MSU6, investigada por Maruthiah et al. (2013), permaneceram estáveis nas temperaturas de 40 e 50 °C durante 150 e 75 minutos respectivamente, as enzimas apresentaram ainda, estabilidade em pH 9,0 por 180 minutos e pH 10,0 durante 90 minutos. Os resultados dos estudos descritos anteriormente confirmam que há uma forte inter-relação entre o habitat de origem do micro-organismo com as características de suas biomoléculas. De acordo com Siddiqui; Cavicchioli (2006), proteínas provenientes de psicrófilos apresentam mais termolabilidade e flexibilidade do que as secretadas por seus homólogos. A alta flexibilidade da molécula é acompanhada de baixa rigidez, conferindo a proteína menor entalpia de ativação, em contrapartida, maior labilidade térmica. Contudo, a termolabilidade da protease secretada por *Acremonium* sp. L1-4B avaliada neste estudo, também pode ser considerada como vantagem no desenvolvimento de alguns processos industriais. De acordo com Vázquez et al. (2008), a labilidade térmica advinda de proteases microbianas também pode ser uma característica desejada em alguns procedimentos biotecnológicos, como na indústria de alimentos já que podem ser seletivamente inativadas no cozimento do alimento. Além do que, a atividade destas biomoléculas microbianas pode ser explorada, por exemplo, na produção de hidrolisados de proteicos, pois, provocam menos amargura no alimento do que quando são utilizadas enzimas de origem animal.

Efeito do NaCl na reação catalítica

A enzima apresentou tolerância frente concentrações de NaCl que variaram entre 500 e 3000 mM. A atividade relativa da enzima em 500 mM de NaCl permaneceu em 100%, com 1000 mM de NaCl caiu para 72%. Sumarizando, o aumento progressivo da concentração do sal proporcionou a diminuição da atividade enzimática. Todavia, a atividade relativa foi de 48% quando a catálise ocorreu na presença de NaCl 3000 mM (Fig. 3). Resultados similares foram encontrados no estudo da protease proveniente da mesófila *Bacillus subtilis* AP-MSU 6, onde, Maruthiah et al. (2013), observaram que houve atividade catalítica nas concentrações de 500 mM a 2500 mM de NaCl, exibindo 74,47% de atividade relativa na concentração de 1000 mM de NaCl e em torno de 40% em 2500 mM. Annamalai et al. (2014), sugerem que enzimas com alta tolerância a sal são instrumentos indispensáveis nos processos biotecnológicos dependentes de alta salinidade ou pressão osmótica.

Efeito de surfactantes e outras substâncias na atividade enzimática

O efeito de surfactantes, agente clareador, desnaturante e redutor na atividade enzimática foram apresentados na Tabela 8. Com a adição de Tween 20 e Tween 80 na mistura reacional, houve discreto aumento de 1 e 12%, respectivamente, na atividade enzimática relativo ao controle. No entanto, o acréscimo de Triton X-100 e do PEG ocasionou decréscimo catalítico de 7 e 4% respectivamente. O H₂O₂ potencializou a atividade enzimática em 34%, da mesma forma, observou-se um aumento de 4% sob influencia da ureia. O agente redutor β-mercaptoethanol avaliado nas concentrações de 1 e 5 mM causou uma diminuição na atividade enzimática de 4 e 7%, respectivamente. Resultados similares foram observados na protease ativa ao frio obtida por Wang et al. (2008), onde o Tween 80 proporcionou um aumento de 11% na catálise, entretanto, a adição do Triton X-100 apresentou decréscimo de 31,5%. A protease secretada por um termofílico, estudada por Zanthorlin et al. (2011), foi influenciada negativamente na presença de Triton X-100, Tween 80, exibindo um decréscimo

de 11,4 e 80% respectivamente, contudo, a atividade relativa foi potencializada na adição de Tween 20 em 17,2%.

Efeito de inibidores de proteases

O extrato enzimático foi avaliado frente os inibidores de protease EDTA, ácido iodoacético, PMSF e pepstatina A, a enzima secretada por *Acremonium* sp. L1-4B sofreu inibição na presença do PMSF, apresentando ao fim atividade relativa de 6 e 3%, nas concentrações de 1 e 10 mM, respectivamente (Tabela 8). A inibição por PMSF também foi observada por Anitha; Palanivelu, (2013), em estudos com protease secretada por *Aspergillus parasiticus*, quando submetida à concentração de 0,1 mM de PMSF apresentou atividade relativa em torno de 2%, entretanto, a 1 mM não exibiu propriedades catalíticas. Da mesma forma, Zanthorlin et al. (2011), detectaram inibição total da enzima produzida pelo termofílico *Myceliophthora* sp. por influência do PMSF (5mM). Cavello et al. (2013), verificaram que a protease secretada por *Purpureocillium lilacinum* LPS#876 exibiu 1,8% de atividade relativa na presença do PMSF a 1,0 mM. A inibição enzimática por PMSF sugere a inserção destas enzimas no grupo das serino proteases.

Determinação da massa molar e zimografia

A avaliação do perfil de eletroforético das proteínas presentes no extrato bruto secretado pelo psicrófilo *Acremonium* sp. L1-4B permitiu detectar a presença de diferentes bandas. No entanto, a protease possivelmente tem massa molecular de 59 kDa, identificada através da zimografia contendo gelatina como substrato (Fig. 4). Massas moleculares diferentes foram encontradas nas proteases secretadas através dos micro-organismos psicrófilos *Pseudoalteromonas* sp. NJ276, com 28 kDa (WANG et al., 2008); *Psychrophilum flavobacterium*, 62 kDa (SECADES et al., 2003); *Cryoconitis pedobacter*, 27 kDa (MARGESIN et al., 2008); e *Pseudomonas* sp., 45 kDa (VAZQUEZ et al., 2004).

CONCLUSÃO

O planejamento fatorial 2³, associado com planejamento composto central sob a metodologia de superfície de resposta mostraram-se um conjunto de ferramentas indispensáveis para estabelecer um método de produção de protease dinâmica e eficiente, por meio do fungo *Acremonium* sp. L1-4B e palma forrageira (*Opuntia fícus indica* Mill.). A serino protease obtida no estudo apresentou estabilidade em toda faixa de pH testado, tolerância para diferentes concentrações de NaCl, surfactantes, agentes de branqueamento e redutor, bem como a química desnaturante, apresentando, assim, as características que sugerem uma grande variedade de aplicações em processos biotecnológicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação Estadual de Pesquisa de São Paulo (FAPESP Grant 2013/19486-0) e a Capes (PROCAD NF 717/2010). A Universidade Federal Rural de Pernambuco. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro e estrutural.

REFERÊNCIAS

- Abidi, F., Chobertb, J.M., Haertléb, T., Marzoukia, M.N., 2011. Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. *Process. Biochem.* 46, 2301-2310.
- Anitha, T.S., Palanivelu, P., 2013. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. *Protein Express. Purif.* 88, 214-220.
- Annamalai, N., Rajeswari, M.V., Balasubramanian, T., 2014. Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveyuensis* CAS 5 using marine wastes. *Food Bioprod. Process.* 92 (4), 335-342.
- Badoei-Dalfard, A., Karami, Z., 2013. Screening and isolation of an organic solvent tolerant-

protease from *Bacillus* sp. JER02: Activity optimization by response surface methodology. J. Mol. Catal. B Enzym. 89, 15-23.

Bezerra, J.D.P., Santos, M.G.S., Svedese, V.M., Lima, D.M.M., Fernandes, M.J.S., Paiva, L.M., Souza-Motta, C.M., 2012. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. World J. Microb. Biot. 28, 1989-1995.

Castro, R.J.S., Sato, H.H., 2013. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and α -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. Ind. Crop. Prod. 49, 813-821.

Cavello, I.A., Hours, R.A., Rojas, N.L., Cavalitto, S.F., 2013. Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. Process. Biochem. 48, 972-978.

Charney, J., Tomarelli, R.M., 1947. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. J. Biol. Chem. 170 (23), 501-505.

Egito, A.S., Girardet, J.M., Laguna, L.E., Poirson, C., Mollé, D., Miclo, L., Humbert, G., Gaillard, J.L., 2007. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. Int. Dairy J. 17, 816-825.

Fleuri, L.F., Sato, H.H., 2008. Study of different parameters in the production of lytic enzymes. Food Sci. Technol. 28 (2), 299-310.

Gomes, J.E.G., Nascimento, T.C.E.S., Queiroz, A.E.S.F., Júnior, J.I.S.S., Souza-Motta, C. M., Medeiros, E.V., Moreira, K.A., 2014. Production, characterization and evaluation of *in vitro* digestion of phytases, xylanases and cellulases for feed industry. Afr. J. Microbiol. Res. 8 (6), 551-558.

Gomes, J., Steiner, W., 2004. Extremophiles and extremozymes. Food Technol. Biotechnol. 42 (4), 223-235.

- Irwin, J.A., Alfredsson, G.A., Lanzetti, A.J., Gudmundsson, H.M., Engel, P.C., 2001. Purification and characterisation of a serine peptidase from the marine psychrophile strain PA-43. *FEMS Microbiol. Lett.* 201, 285-290.
- Joshi, S., Satyanarayana, T., 2013. Biotechnology of cold-active proteases. *Biology* 2, 755-783.
- Kammoun, R., Naili, B., Bejar, S., 2008. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresour. Technol.* 99, 5602-5609.
- Kumar, R.S., Ananthan, G., Prabhu, A.S., 2014. Optimization of medium composition for alkaline protease production by *Marinobacter* sp. GA CAS9 using response surface methodology – a statistical approach. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3, 191-197.
- Kumar, A.P.K., Suresh, P.V., 2014. Biodegradation of shrimp biowaste by marine *Exiguobacterium* sp. CFR26M and concomitant production of extracellular protease and antioxidant materials: production and process optimization by response surface methodology. *Mar. Biotechnol.* 16, 202-218.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), 680-685.
- Maciel, M.H.C., Herculano, P.N., Porto, T.S., Teixeira, M.F.S., Moreira, K.A., Souza-Motta, C.M., 2011. Production and partial characterization of pectinases from forage palm by *Aspergillus niger* URM 4645. *Afr. J. Biotechnol.* 10 (13), 2469-2475.
- Margesin, R., Dieplinger, H., Hofmann, J., Sarg, B., Lindner, H., 2008. A cold-active extracellular metalloprotease from *Pedobacter cryoconitis* - production and properties. *Res. Microbiol.* 156 (4), 499-505.
- Maruthiah, T., Esakkiraj, P., Prabakaran, G., Palavesam, A., Immanuel, G., 2013. Purification and characterization of moderately halophilic alkaline serine protease from marine *Bacillus*

subtilis AP-MSU 6. Biocatal. Agric. Biotechnol. 2, 115-119.

Meena, P., Tripathi, A.D., Srivastava, S.K., Jha, A., 2013. Utilization of agro-industrial waste (wheat bran) for alkaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* in SSF using Taguchi (DOE) methodology. Biocatal. Agric. Biotechnol. 2, 210-216.

Mnif, I., Chaabouni-Ellouze, S., Ghribi, D., 2012. Optimization of the nutritional parameters for enhanced production of *B. subtilis* SPB1 biosurfactant in submerged culture using response surface methodology. Biotechnol. Res. Int. 2012, 1-8.

Oliveira, A.S.C., Filho, F.N.C., Rangel, A.H.N., Lopes, K.B.P., 2011. The cactus pear: alternative to the semi-arid. Rev. Verde. Agroecologia desenvolv Sustent 6 (3), 49-58.

Sáenz, C., Sepúlveda, E., Matsuhira, B., 2004. *Opuntia* spp. mucilage's a functional component with industrial perspectives. J. Arid. Environ. 57, 275-290.

Savitha, S., Sadhasivam, S., Swaminathan, K., LIN, F.H., 2011. Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. J. Taiwan Inst. Chem. Eng. 42 (2), 298-304.

Secades, P., Alvarez, B., Guijarro, J.A., 2003. Purification and properties of a new psychrophilic metalloprotease (Fpp2) in the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. FEMS Microbiol. Lett. 226, 273-279.

Shankar, S., Rao, M., Laxman, R.S., 2011. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. Process. Biochem. 46, 579-585.

Shabbiri, K., Adnan, A., Jamil, S., Ahmad, W., Noor, B., Rafique, H.M., 2012. Medium optimization of protease production by *Brevibacterium linens* DSM 20158, using statistical approach. Braz. J. Microbiol. 43 (3), 1051-1061.

Siddiqui, K.S., Cavicchioli, R., 2006. Cold-adapted enzymes. Annu. Rev. Biochem. 75, 403-433.

Vazquez, S.C., Coria, S.H., Mac Cormack, W.P., 2004. Extracellular proteases from eight

psychrotolerant Antarctic strains. Microbiol. Res. 159, 157-166.

Vázquez, S.C., Hernández, E., Mac Cormack, W.P., 2008. Extracellular proteases from the Antarctic marine *Pseudoalteromonas* sp. P96-47 strain. Rev. Argent. Microbiol. 40, 63-71.

Wang, Q.F., Hou, Y.H., Xu, Z., Miao, J.L., Li, G.Y., 2008. Purification and properties of an extracellular cold-active protease from the psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. NJ276. Biochem. Eng. J. 38, 362-368.

Zanphorlin, L.M., Cabral, H., Arantes, E., Assis, D., Juliano, L., Juliano, M.A., Da-Silva, R., Gomes, E., Bonilla-Rodriguez, G.O., 2011. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. Process. Biochem. 46, 2137-2143.

TABELAS

Tabela 1. Valores reais e codificados para a otimização da produção de proteases por *Acremonium* sp. L1-4B, usando o Delineamento Composto Central.

Variáveis independentes	Unidade	Níveis				
		- α *	-1	0	+1	+ α
Temperatura	°C	13,0	14,0	15,0	16,0	17,0
pH		6,5	7,0	7,5	8,0	8,5
Extrato de levedura	%	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8

* 1,682.

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial 2^3 com três pontos centrais, contendo dados experimentais da atividade total da protease produzida por *Acremonium* sp. L1-4B.

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Extrato de levedura (%)	Atividade proteásica (U/mL)
1	15,0	4,0	0,5	189,75±0,00
2	25,0	4,0	0,5	15,22±0,01
3	15,0	8,0	0,5	191,32±0,00
4	25,0	8,0	0,5	35,42±0,00
5	15,0	4,0	1,5	135,30±0,02
6	25,0	4,0	1,5	0,07±0,00
7	15,0	8,0	1,5	10,57±0,00
8	25,0	8,0	1,5	5,77±0,01
9	20,0	6,0	1,0	53,47±0,00
10	20,0	6,0	1,0	33,75±0,00
11	20,0	6,0	1,0	48,15±0,03

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) para produção de proteases por *Acremonium* sp.

L1-4B de acordo com o planejamento fatorial 2^3 com três pontos centrais.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Estatístico <i>F</i>	<i>p</i> -valor
Regressão	48435,98	6	8072,66	9,34	0,0243*
Resíduo	3457,29	4	864,32		
Falta de ajuste	3249,11	2	1624,55	15,61	0,060
Erro puro	208,18	2	104,09		
Total	51893,26	10			

* Estatisticamente significativa. Nível de confiança 95%.

Tabela 4. Estimativa dos efeitos das variáveis na produção de protease por *Acremonium* sp.

L1-4B de acordo com o planejamento fatorial 2^3 com três pontos centrais.

Variáveis	Efeitos	<i>t</i>	<i>p-valor</i>
(1) Temperatura	-117,615	-16,3032	0,003 s
(2) pH	-24,315	-3,3704	0,077 ms
(3) Extrato de levedura	-70,000	-9,7030	0,010 s
1 por 2	37,265	5,1655	0,035 s
1 por 3	47,600	6,5981	0,022 s
2 por 3	-35,200	-4,8792	0,039 s

ms: Marginalmente significativa. s: Estatisticamente significativa. Nível de confiança 95 %.

Tabela 5. Matriz do planejamento DCC, contendo atividade proteásica como variável resposta e os dados previstos no modelo.

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Extrato de levedura (%)	Atividade proteásica (U/mL)	
				Experimental	Calculado
1	16,0	8,0	0,6	401,70±4,24	386,84
2	16,0	8,0	0,2	373,20±0,85	363,02
3	14,0	7,0	0,6	440,85±1,06	433,06
4	16,0	7,0	0,2	369,75±1,06	349,47
5	15,0	7,5	0,4	451,50±4,67	440,21
6	15,0	7,5	0,4	431,25±8,70	440,21
7	15,0	7,5	0,4	423,00±2,97	440,21
8	15,0	6,5	0,4	394,05±7,85	399,94
9	15,0	7,5	0,0	304,05±3,18	330,00
10	16,0	7,0	0,6	374,85±1,06	381,55
11	13,0	7,5	0,4	380,25±6,15	391,36
12	15,0	7,5	0,8	422,85±1,91	422,29
13	15,0	7,5	0,4	459,45±5,73	440,21
14	14,0	8,0	0,2	381,45±8,70	356,78
15	14,0	7,0	0,2	350,25±5,30	347,13
16	17,0	7,5	0,4	339,00±3,39	412,50
17	15,0	8,5	0,4	393,00±6,36	412,50
18	14,0	8,0	0,6	432,15±1,91	434,46

Tabela 6. Estimativa dos efeitos das variáveis na produção protease por *Acremonium* sp. L1-4B conforme o planejamento DCC.

Variáveis	Efeitos	<i>t</i>	<i>p</i>-valor
Temperatura (°C) (L)	-22,64	-2,46	0,091 ms
Temperatura (°C) (Q)	-48,00	-5,014	0,015 s
pH (L)	7,47	0,81	0,476
pH (Q)	-24,03	-2,51	0,087 ms
Extrato de levedura (%) (L)	54,87	5,96	0,009 s
Extrato de levedura (%) (Q)	-45,30	-4,73	0,018 s
Temperatura (°C) x pH	1,95	0,16	0,881
Temperatura (°C) x Extrato de levedura (%)	-26,93	-2,24	0,111
pH x Extrato de levedura (%)	-4,13	-0,34	0,754

ms: Marginalmente significante. s: Estatisticamente significante. Nível de confiança 95 %.

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) dos dados apresentados na Tabela 5.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	<i>F</i>cal	<i>F</i>tab	<i>p</i>-valor
Regressão	29313,71	9	3257,08	6,94	3,39	0,005*
Resíduo	3754,88	8	469,36			
Falta de ajuste	2885,52	5	577,10	1,99	9,01	0,302
Erro puro	869,35	3	289,78			
Total	29073,51	17				

* Estatisticamente significativa. *F*cal: *F* calculado; *F*tab: *F* tabelado. Nível de confiança 95%.

Tabela 8. Efeito de surfactantes, agente branqueador, desnaturante químico e inibidores na atividade proteásica.

Substância	Concentração	Atividade relativa (%)*
Nenhuma		100
Surfactantes		
Tween 20	5% (v/v)	101±2,4
Tween 80	5% (v/v)	112±1,0
Triton X-100	5% (v/v)	93±5,7
PEG 2000	5% (v/v)	96±4,6
Agente branqueador		
H ₂ O ₂	5% (v/v)	134±3,3
Agente desnaturante		
Ureia	5% (w/v)	104±2,1
Agente redutor		
β-mercaptoetanol	1 mM	96±2,7
β-mercaptoetanol	5 mM	93±1,3
Inibidor		
EDTA	1 mM	83±0,9
EDTA	10 mM	83±1,8
PMSF	1 mM	6±0,3
PMSF	10 mM	3±0,3
Ácido Iodoacético	1 mM	103±1,1
Ácido Iodoacético	10 mM	100,7±0,5
Pepstatina A	0,1 mM	100,5±2,3

*Dados apresentados como atividade relativa (%) ± Desvio padrão.

FIGURAS

Fig. 1. Superfície de resposta e curvas de contorno para a produção de protease por *Acremonium* sp. L1-4B, interação de temperatura e pH (A), em função da temperatura e concentração de extrato de levedura (B), e do extrato de levedura e pH (C).

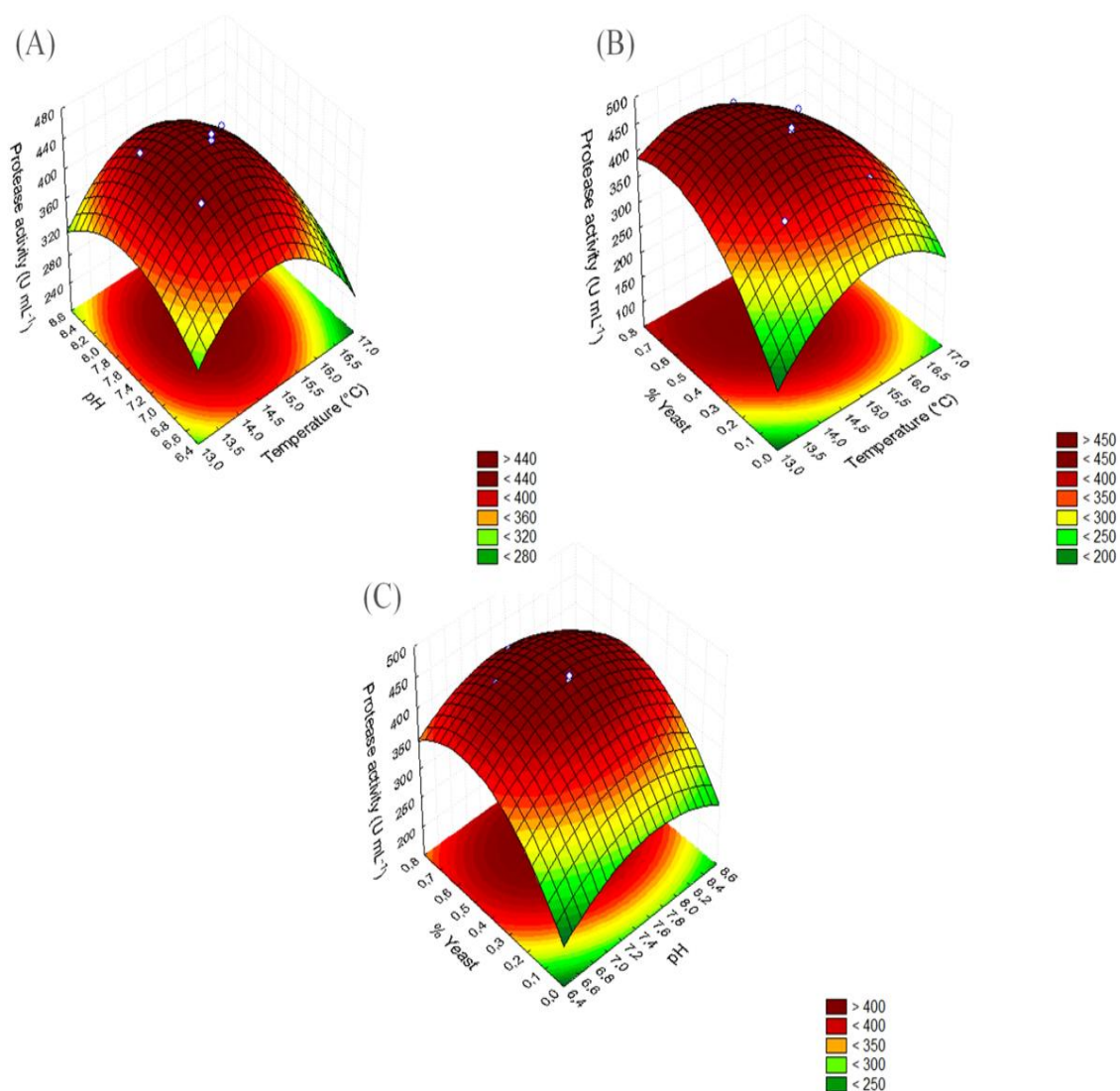


Fig. 2. Efeitos da temperatura (A) e do pH (B) sobre a atividade e a estabilidade aos 180 minutos da protease produzida por *Acremonium* sp. L1-4B.

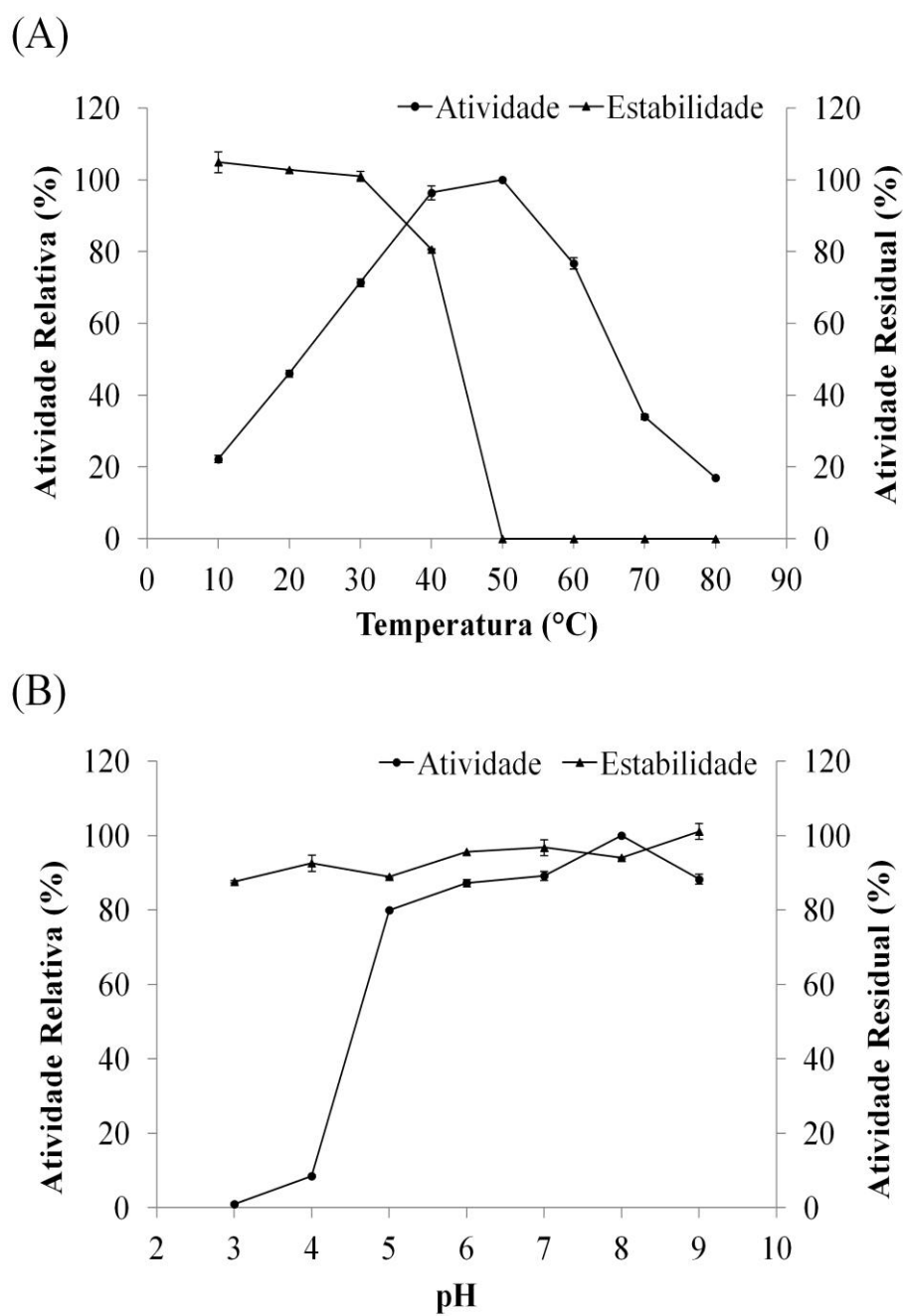


Fig. 3. Efeito da concentração de NaCl na atividade catalítica de proteases produzidas por *Acremonium* sp. L1-4B.

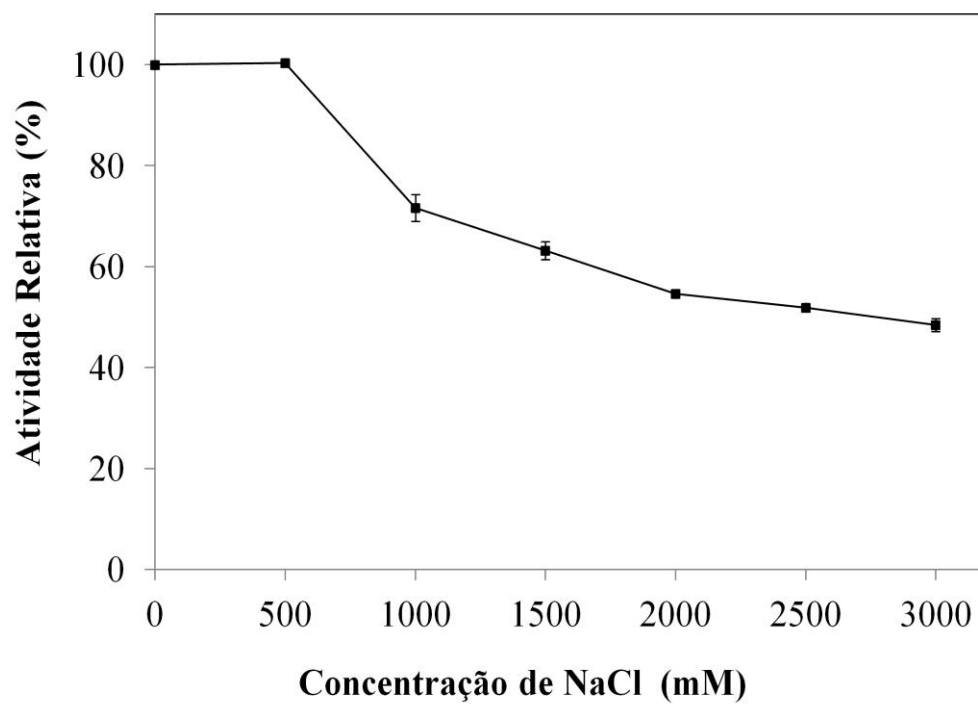
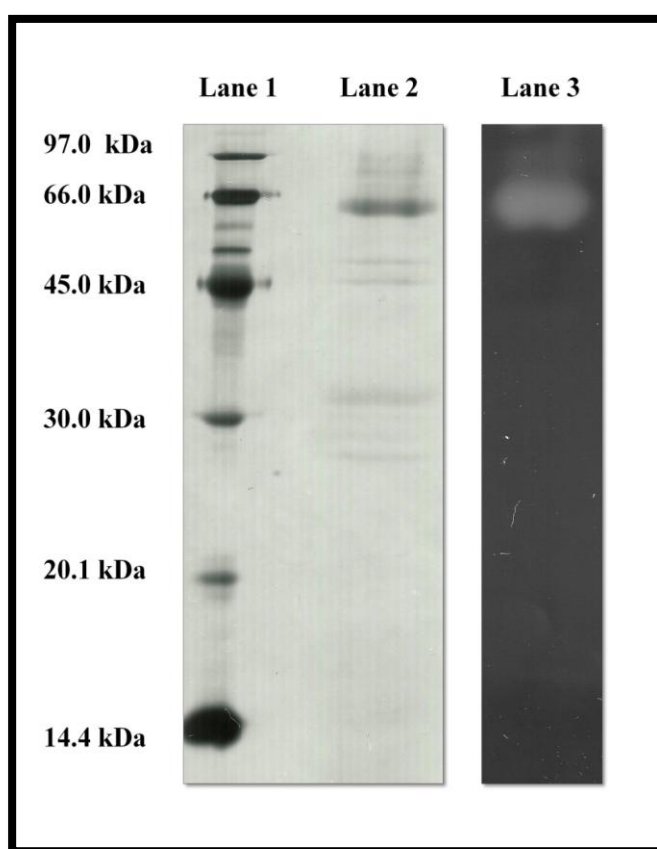


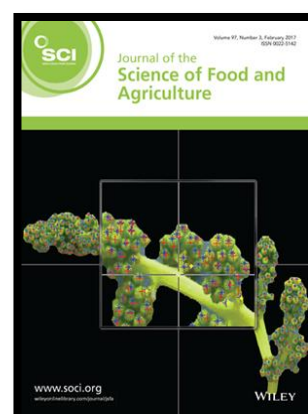
Fig. 4. Eletroforese SDS-PAGE e zimograma da protease secretada por *Acremonium* sp. L1-4B. Coluna 1: marcador padrão de massa molecular (14,4 kDa - α -lactalbumina; 20,1 kDa - inibidor de tripsina; 30,0 kDa - anidrase carbônica; 45,0 kDa - ovalbumina; 66,0 kDa - albumina de soro bovino; 97,0 kDa - fosforilase B); Coluna 2: extrato enzimático bruto; Coluna 3: zimografia.



CAPÍTULO II

**Prospecção de peptídeos bioativos em hidrolisados de caseinato caprino e bovino:
Avaliação *in vitro* das atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-hipertensiva**

A ser submetido à revista:



Journal of the Science of Food and Agriculture

ISSN: 1097-0010

Guia para autores disponível em:

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1097-0010/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1097-0010/homepage/ForAuthors.html)

**Prospecção de peptídeos bioativos em hidrolisados de caseinato caprino e bovino:
Avaliação *in vitro* das atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-hipertensiva**

Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento^a; João Vitor Dutra Molino^b; Priscila Robertina dos Santos Donado^b; Gualberto Segundo Agamez Montalvo^c; Wellington Leal dos Santos^a; José Erick Galindo Gomes^d; Roberto da Silva^d, Lara Durães Sette^e; Adalberto Pessoa Junior^b; Keila Aparecida Moreira^{f*}

^aDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Pernambuco, Brasil. E-mail: talitacamila07@gmail.com; wellingtonleal16@gmail.com

^bDepartamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil. E-mail: candidomolino@gmail.com; pessoajr@usp.br

^cInstituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo, São Paulo. Brasil. E-mail: gsagamez@gmail.com

^dLaboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Universidade do Estado de São Paulo. São Paulo, Brasil. E-mail: erick.galindo.zoo@hotmail.com; dasilva@ibilce.unesp.br

^eDepartamento de Bioquímica e Microbiologia, Universidade do Estado de São Paulo. São Paulo, Brasil. E-mail: larasette@rc.unesp.br

^fUnidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Pernambuco, Brasil. E-mail: wellingtonleal16@gmail.com; moreirakeila@hotmail.com

***Autor de Correspondência:** moreirakeila@hotmail.com

Tel: +55 (87) 37645520 ou +55 (87) 92433912.

**Prospecção de peptídeos bioativos em hidrolisados de caseinato caprino e bovino:
Avaliação *in vitro* das atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-hipertensiva**

RESUMO

RELEVÂNCIA: Caseínas são importantes proteínas do leite, apreciadas como precursoras de peptídeos bioativos que podem ser liberados por proteólise, algumas destas sequências peptídicas apresentam funcionalidades que podem direcioná-las para indústria de alimentos e farmacêutica. Objetivou-se avaliar *in vitro* o potencial antioxidante, antimicrobiano e inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) em hidrolisados de caseinato bovino e caprino gerados a partir da protease de *Acremonium* sp. L1-4B e identificar as sequências resultantes por espectrometria de massas.

RESULTADOS: Os hidrolisados promoveram inibição da ECA, sequestro radicalar e quelação de metais de transição. As bactérias Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031; *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048) foram inibidas pelas amostras caprina e bovina. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positiva) só foi inibida na presença da amostra caprina. Análises de MS/MS prospectaram 23 e 31 sequências peptídicas nos hidrolisados bovino e caprino, respectivamente. Alguns destes peptídeos já foram descritos na literatura como bioativos, contudo, é importante resaltar que todas as sequências resultantes precisam ser estudadas a fim de identificar e caracterizar novos peptídeos biogênicos.

CONCLUSÃO: A proteólise proposta mostrou-se eficiente na libertação de peptídeos bioativos derivados dos caseinatos bovino e caprino. Sugerindo que esses hidrolisados podem ser incorporados a alimentos funcionais para prevenir doenças, para conservação de alimentos ou até mesmo desenvolvimento de fármacos.

Palavras-chave: Peptídeos bioativos; Prospecção peptídica; Caseinato bovino; Caseinato caprino; Bioatividade.

Prospecting of bioactive peptides in caprine and bovine caseinate hydrolysates: *In vitro* evaluation of antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities

ABSTRACT

BACKGROUND: Caseins are important milk proteins, assessed as precursors of bioactive peptides that can be released by proteolysis, some of these peptide sequences have functionalities that can direct them to the food and pharmaceutical industry. The objective was to evaluate the antioxidant, antimicrobial and inhibitory potential of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) in bovine and goat caseinate hydrolysates generated from the protease of *Acremonium* sp. L1-4B and identifying the resulting sequences by mass spectrometry.

RESULTS: The hydrolysates promoted ACE inhibition, radical sequestering and metals of chelation. Gram-negative bacteria (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031; *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048) were inhibited by caprine and bovine samples. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positive) was only inhibited in the presence of the goat sample. MS/MS analysis prospected 23 and 31 peptide sequences in bovine and goat hydrolysates, respectively. Some of these peptides have already been described in the literature as bioactive, however, it is important to note that all the resulting sequences need to be studied in order to identify and characterize new biogenic peptides.

CONCLUSION: The proposed proteolysis has been shown effective in the release of biologically active peptides derived from bovine and goat caseinates. It suggests that these hydrolysates can be incorporated into functional foods to prevent disease, food preservation or even drug development.

Keywords: Bioactive peptides; Peptide prospection; Bovine caseinate; Caprine caseinate; Bioactivity.

INTRODUÇÃO

Proteínas de origem alimentícia têm sido reportadas como detentoras de diversas sequências peptídicas que possuem atividades biológicas. Comumente liberados através da hidrólise enzimática estes peptídeos bioativos são biomoléculas ubíquas capazes de atuar como agentes antimicrobianos, anti-hipertensivos, antioxidantes, imunomoduladores e antitrombóticos, por isso sua ampla visibilidade no desenvolvimento de produtos terapêuticos e alimentos funcionais (AGYEI et al., 2016; MOHANTY et al., 2016).

De modo geral, peptídeos provenientes de proteínas de alimentos apresentam baixa toxicidade, são eficientes na promoção de saúde desencadeando respostas fisiológicas benéficas ao organismo e apresentam menos efeitos colaterais. Todavia, o custo da produção e purificação em grande escala destas biomoléculas ainda é alto, por isso, estudos têm sido realizados para superar este obstáculo da indústria (AGYEI; DANQUAH, 2011).

Uma das estratégias para aumentar a escala de produção de hidrolisados protéicos é baseada na utilização de proteases microbianas para clivagem das proteínas. Estas enzimas proteolíticas podem ser obtidas de forma rápida e em abundância a partir de micro-organismos quando tem sua metodologia de produção preconizada (CORRÊA et al., 2011). Sequências peptídicas podem ser geradas ainda por proteólise direta, ou seja, agregando um micro-organismo proteolítico na proteína alvo. E por ação das enzimas gastrointestinais *in vivo* (DANQUAH; AGYEI, 2012).

Usualmente, peptídeos detêm atributos das suas proteínas nativas, características físicas e químicas que podem influenciar em suas bioatividades. Peptídeos provenientes de proteínas do leite caprino, bovino, bubalino, ovino e de camelo têm demonstrado múltiplas formas de atuação contra micro-organismos patogênicos inclusive no combate de infecções multirresistentes. Já foram identificadas moléculas que atuam como ligantes de minerais, quelante de íons metálicos, moduladores do sistema imune, inibidores de enzimas e

eliminadores de radicais livres (JÄKÄLÄ; VAPAATALO, 2010; AGYEI et al., 2016; MOHANTY et al., 2016).

Peptídeos antioxidantes podem impedir ou retardar a peroxidação de lipídeos e a formação de radicais livres. O organismo é capaz de produzir substâncias antioxidantes para atuar na prevenção e na regeneração dos danos oxidativos, porém, quando esses agentes são insuficientes para sequestrar o conteúdo de radicais livres produzidos, ocorre um distúrbio chamado estresse oxidativo que desencadeia ações deletérias sobre as células, conduzindo ao desenvolvimento de enfermidades (ALVES et al., 2010; LI et al., 2013).

Alguns peptídeos derivados de leite apresentam capacidade de inibir a enzima conversora de angiotensina, atuando assim na regulação da pressão arterial. Uma vez que a ECA converte a angiotensina I em angiotensina II, que atua na constrição de veias, arteríolas e na liberação de aldosterona, diretamente relacionadas ao aumento da pressão sanguínea (JÄKÄLÄ; VAPAATALO, 2010).

Neste contexto, este estudo teve por objetivo avaliar *in vitro* as atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-hipertensiva das frações de baixa massa molecular dos hidrolisados de caseinato caprino e bovino obtidos através da protease secretada por *Acremonium* sp. L1-4B e detectar os peptídeos presentes nos hidrolisados.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

ABTS (2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico); acrilamida; azocaseína; bis-acrilamida; caseinato sódico de leite bovino; DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil); ECA (enzima conversora de angiotensina) de pulmão de coelho, ferrozina (3-(2-Piridil)-5-6-bis (4-ácido fenil sulfônico)-1,2,4, triazina); HHL (hipuril-histidil-leucina), TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina.); TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico); tricina (N-[tris(hidroximetil)metil]glicina); tris (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol); ureia;

violeta de pirocatecol, todos adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O hidróxido de potássio foi obtido da Química Moderna (São Paulo, Brasil). E o ácido tricloroacético da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Os demais reagentes empregados foram de grau analítico.

Micro-organismo e produção enzimática

Para a produção extracelular de proteases foi utilizado o fungo filamentoso *Acremonium* sp. L1-4B isolado de amostras da Antártica, de acordo com a metodologia descrita em Nascimento et al. (2015).

Purificação parcial

O extrato enzimático livre de células foi fracionado por ultrafiltração com membrana de corte de massa molecular de 30 kDa Amicon® Ultra-15 (Millipore Ireland Ltd, Tullagreen, Irlanda), durante 40 minutos a 4 °C, 4000 x g. O retido (> 30 kDa) foi resuspenso no volume inicial em tampão tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM e glicina 100 mM, pH 8,0. Posteriormente aplicado em coluna de exclusão molecular Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), acoplada ao sistema ÄKTA™ FPLC™ (GE Healthcare, Uppsala, Suíça). A coluna foi previamente equilibrada com o tampão de trabalho descrito acima, e a purificação transcorreu em fluxo de fase móvel de 1 mL min⁻¹, coletadas frações de 2,0 mL. A fração que apresentou atividade proteásica foi congelada a -20 °C até sua utilização.

Determinação da atividade proteásica e proteínas totais

A atividade proteásica foi determinada de acordo com Charney; Tomarelli, (1947), com modificações. Onde, a reação contendo 500 µL de azocaseína 0,5% (m/v) em tris HCl 50 mM, pH 8,0 e 500 µL do extrato enzimático foi incubada por 40 minutos a 50 °C, interrompida por adição de 500 µL de ácido tricloroacético 10%. Centrifugada (4000 x g, 4 °C por 10 minutos); posteriormente, 500 µL do sobrenadante foi adicionado a 500 µL de hidróxido de potássio 500 mM, e a absorbância mensurada em 430 nm. Uma unidade da atividade enzimática (U) foi considerada como a quantidade de enzima capaz de produzir um

aumento na absorbância de 0,001 por 40 minutos. Para determinar proteínas totais foi utilizado o kit de proteína contendo ácido bicinonínico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), de acordo com a metodologia sugerida pelo fabricante. A curva de calibração foi realizada com soro albumina bovina (BSA) como padrão.

Caseinato sódico bovino e caprino

O caseinato sódico bovino foi adquirido comercialmente. E o caprino foi obtido a partir do leite de cabra da raça Saanen, através do método proposto por Egito et al. (2006), com pequenas modificações. O leite cru foi centrifugado ($2100 \times g$, 32 °C, 30 minutos), submetido à precipitação isoeletrica no pH 4,2 por adição de HCl 1 M, centrifugado ($1500 \times g$, 10 °C, 20 minutos). O precipitado foi solubilizado no pH 7,0 por adição de NaOH 1 M. O processo envolvendo a precipitação e solubilização foi repetido três vezes, por fim, o caseinato foi dialisado contra água, na temperatura de 4 °C por 72 horas, liofilizado e estocado a -20 °C.

Hidrólise do caseinato

Amostras de caseinato sódico 10 mg mL^{-1} em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 6,5) foram submetidas a hidrólise por adição da protease parcialmente purificada (relação enzima:substrato 1:68 v/v), na temperatura de 30 °C, em agitador orbital a 150 rpm. A hidrólise foi interrompida em diferentes tempos (0, 2, 4, 8 e 24 h), por aquecimento a 100 °C durante 10 minutos e armazenada a -20 °C.

Grau de hidrólise

A determinação do grau de hidrólise através do TNBS (2,4,6-ácido trinitrobenzeno sulfônico), foi realizada segundo a metodologia descrita por Adler-Nissen (1979), com modificações. Onde, 31,25 µL do hidrolisado proteico foram misturados com 250 µL de tampão fosfato de sódio (0,212 M, pH 8,2) e 250 µL de TNBS 0,1% (v/v H₂O ultra pura). Incubados na temperatura de 50 °C, por 1 hora, a reação foi interrompida por adição de 500

μL HCl 0,1 M. Incubados em temperatura ambiente $\pm 25^\circ\text{C}$ na proteção da luz por 30 minutos, e mensurado a 340 nm no SpectraMax[®] Plus 384 (Molecular Devices, LLC, Califórnia, EUA). Os grupos de aminoácidos totais foram determinados tendo como referência a hidrólise do caseinato (10 mg) em 4 mL de HCl 6 M, na temperatura de 110°C , por 24 horas (CORREA et al., 2011).

Eletroforese tricina-SDS-PAGE

A tricina-SDS-PAGE foi realizada segundo o método descrito por Schägger (2006). Usando o tampão cátodo (tris HCl 0,1 M, tricina 0,1 M, SDS 0,1% pH 8,25), e o ânodo (tris HCl 0,2 M pH 8,9), na corrida. O gel de concentração foi de 4% e de separação 16%. Foi usado o padrão de massa molar Precision Plus Protein[™] Dual Xtra (Bio-Rad, Califórnia, EUA). Corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 e contra corado na ausência do marcador molecular com prata, por meio do kit Silver Stain Plus[™] (Bio-Rad, Califórnia, EUA).

Fracionamento dos hidrolisados protéicos por ultrafiltração

Os hidrolisados foram fracionados por ultrafiltração utilizando membrana de corte (*cut off*) de 10 kDa, Amicon[®] Ultra-15 (Millipore Ireland Ltd, Tullagreen, Irlanda), durante 40 minutos a 4°C , $4000 \times g$. O permeado (< 10 kDa) foi congelado a -20°C e utilizado nos ensaios subsequentes.

Avaliação do potencial antioxidante, antimicrobiano e anti-hipertensivo das frações dos hidrolisados proteicos (< 10 kDa).

Determinação da atividade sequestradora do radical DPPH[•]

Realizada segundo a metodologia descrita por Li et al. (2013), com modificações. O radical DPPH[•] (0,2 mM) foi preparado utilizando uma solução hidroalcoólica 3:7 (v/v), imediato ao uso. Para o teste 500 μL da fração proteica, foi acrescida de 500 μL do radical, incubados durante 30 minutos ao abrigo de luz, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a

517 nm. O controle positivo continha H₂O no lugar da amostra. A atividade antioxidante foi calculada em relação ao sequestro do DPPH[•], de acordo com a Equação 1.

$$\text{Atividade sequestrante (\%)} = \left(\frac{A - B}{A} \right) \times 100$$

Equação 1

Sendo *A* a densidade óptica do controle positivo, e *B* a densidade óptica da amostra.

Determinação da atividade sequestradora do ABTS^{•+}

A habilidade da fração protéica sequestrar o radical ABTS foi avaliada de acordo com Re et al. (1999), com modificações. O radical ABTS^{•+}, foi gerado em solução contendo persulfato de potássio (2,45 mM) e ABTS (7 mM), incubado ao abrigo da luz por 12-16 horas e posteriormente a absorbância da solução foi ajustada para 0,70±0,02 no comprimento de 734 nm. No teste, 50 µL do hidrolisado foi adicionado em 950 µL do radical, incubado por 6 minutos, a 30 °C e mensurado a 734 nm. A Equação 1 foi utilizada para calcular a atividade sequestrante (%).

Atividade quelante de ferro

A atividade quelante de Fe²⁺ foi determinada segundo Sánchez-Vioque et al. (2013), onde, 500 µL da amostra foram acrescidos de 2 mL de tampão acetato de sódio (100 mM, pH 4,9), e 50 µL de solução de ferro (2 mM), incubados por 30 minutos, a mistura reacional foram adicionados 200 µL de solução ferrozina (5 mM), incubado por 30 minutos ao abrigo da luz, mensurado a 562 nm em espectrofotômetro. Água destilada foi utilizada no controle negativo. Os testes foram realizados em triplicata e o percentual quelante foi calculado segundo a Equação 2.

$$\text{Atividade quelante (\%)} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100$$

Equação 2

Sendo, A_0 a densidade óptica do controle negativo, e A_1 a densidade óptica da amostra.

Atividade quelante de Cu^{2+}

Para avaliar a capacidade quelante de Cu^{2+} dos hidrolisados, foi utilizado o método descrito por Sánchez-Vioque et al. (2013), a mistura reacional contendo 500 μL da amostra, 2 mL de tampão acetato de sódio (50 mM) pH 6,0, e 50 μL de CuSO_4 (5 mM), incubada por 30 minutos. Logo após foram adicionados 50 μL de violeta de pirocatecol (4 mM), novamente incubado por 30 minutos e a leitura efetuada em espectrofotômetro a 632 nm. As análises foram realizadas em triplicata e o percentual quelante calculado de acordo com a Equação 2.

Atividade antimicrobiana in vitro

O potencial antimicrobiano das frações (< 10 kDa) foi determinado pelo método de turbidez exibido por Wu et al. (2013) com modificações. As cepas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 foram cultivadas em caldo triptona de soja por 8 h a 37 °C, os testes realizados em microplacas de 96 poços de poliestireno (Corning®, Tewksbury, MA). A mistura contendo 100 μL da fração peptídica com 90 μL de caldo Mueller Hinton e 10 μL da suspensão bacteriana (10^8 UFC mL^{-1}) foi incubada a 37 °C durante 24 h. O controle negativo contendo 100 μL de água estéril no lugar da amostra testado dentro das mesmas condições, a absorbância foi mensurada a 600 nm utilizado o SpectraMax® Plus 384 (Molecular Devices, LLC, California, EUA). Os ensaios que exibiram inibição do crescimento microbiano foram representados com o sinal (+) e os que não (-). Neste trabalho são consideradas como inibidoras as amostras que apresentaram percentuais $>1\%$.

Ensaio anti-hipertensivo in vitro

A inibição da ECA foi avaliada empregando a metodologia descrita por Cushman; Cheung, (1971) com adaptações de Zhang et al. (2009), onde 25 μL do hidrolisado e 25 μL de

ECA (5 µm) foram adicionados a 25 µL de HHL (5 mM em tampão fosfato 1 M, pH 8,3), incubado a 37 °C por 30 minutos e a reação foi interrompida acrescentado 75 µL de HCl (1M). Para extrair o ácido hipúrico, foram adicionados 500 µL de acetato de etila, centrifugado (4000 x g) por 10 minutos a 4 °C. E 250 µL da fase orgânica foram transferidos para um tubo de ensaio e evaporados por 10 minutos a 100 °C. O conteúdo residual foi dissolvido em 1500 µL de água deionizada e mensurado em espectrofotômetro a 228 nm, zerado com água deionizada. O percentual de inibição foi calculado a partir da equação:

$$\text{Inibição da ECA (\%)} = \left[\frac{(A - B)}{(A - C)} \right] \times 100$$

Equação 3

Onde, *A* compreende a absorbância da reação contendo ECA e HHL; *B* é a absorbância da reação com o hidrolisado, ECA e HHL; e *C* a absorbância do HHL submetido a todo o ensaio.

Análises estatísticas

Os ensaios foram realizados em triplicata e com os resultados correspondentes foram calculados os desvios padrão. As diferenças significativas ($p < 0,05$) foram identificadas pelo método de Tukey usando software R (R CORE TEAM, 2015).

Identificação do perfil peptídico por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF)

O conteúdo peptídico livre de sal permeado através de ultrafiltração (< 10 kDa) foi concentrado (Centrifuga Vacuo Eppendorf® Concentrator 5301, Hamburg, Alemanha), e estocado a -20 °C. As amostras foram resuspensas em solução de ácido fórmico 0,1% e carregadas em um volume de 1,0 µL no sistema nanoAcquity UPLC® (Waters GmbH, Eschborn, Alemanha). Os peptídeos foram aprisionados (*trapped*) em uma coluna C18 2G-V/MTrap, Symmetry®, 180 µm x 20 mm, tamanho de partícula 5 µm (Waters GmbH, Eschborn, Alemanha), por 3 min com fluxo de 7 µL min⁻¹. A separação foi realizada em

coluna C18 BEH 130, 100 μm $\times$ 100 mm, tamanho de partícula 1,7 μm (Waters GmbH, Eschborn, Alemanha). A fase móvel transcorreu em gradiente de solvente A (ácido fórmico 0,1%) e solvente B (acetonitrila 99,9% e de ácido fórmico 0,1%), com fluxo de 0,4 $\mu\text{L min}^{-1}$ e temperatura de coluna 40 °C.

O sistema nanoAcquity UPLC foi acoplado a um espectrômetro de massas UHR-ESI-Q-TOF Bruker Daltonics MaXis 3G (Bremen, Alemanha) com uma fonte CaptiveSpray (Bremen, Alemanha). O espectrômetro de massas foi operado com voltagem capilar de 3000V, temperatura de desolvatação de 150 °C, gás de secagem a um fluxo de 3 L min^{-1} e a fonte de ionização em modo positivo.

Os espectros foram obtidos utilizando o software MassLynx v.4.1. Os arquivos de dados brutos foram convertidos em formato (.mgf) pelo software Mascot Distiller v.2.5 (Matrix Science, Londres, Reino Unido) e comparados com o banco de dados de *Mammalia* (SwissProt 2016-07, 551.705 sequências; 197.114.987) utilizando o software BiotooolsTM v.3.0 combinado ao MASCOT v.2.5 (Matrix Science, Londres, Reino Unido). Os parâmetros utilizados foram: modificação fixa = carbamidometilação de cisteína; modificação variável = oxidação da metionina; número de clivagens perdidas = 2; enzima utilizada = nenhuma; tolerância de massa peptídica = ± 10 ppm e tolerância de massa do fragmento = $\pm 0,05$ Da e limiar de significância = $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Purificação parcial

No estudo, a protease do *Acremonium* sp. L1-4B foi submetida à ultrafiltração em membrana de corte (30 kDa), com o fracionamento o fator de purificação foi 2,4, e o rendimento 75%. A amostra foi eluída em coluna de gel filtração resultando no aumento do fator de purificação para 25 e rendimento final de 35%, a enzima com atividade específica de 836,2 mg mL^{-1} foi empregada nos ensaios subsequentes de hidrólise dos caseinatos caprino e

bovino. Lario et al. (2015), purificaram uma protease secretada pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L7 isolada na Antártica, utilizando a trocadora catiônica CM-Sepharose FF, recuperando 40,4% da enzima com fator de purificação 41,7, maior do que observado neste estudo. Por outro lado, Abidi et al. (2011), purificando a protease do fungo mesófilo *Botrytis cinerea*, alcançaram um fator de purificação 19, com rendimento de 5,6% depois de submetê-la as etapas de precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e as trocadoras Superdex G-75, SP-Sepharose em FPLC e coluna de gel filtração TSK-GEL G2000SWXL em sistema HPLC.

Grau de hidrólise

A protease secretada por *Acremonium* sp. L1-4B apresentou aptidão para hidrolisar as caseínas do leite caprino e bovino, embora tenha apresentado diferença significativa entre as espécies, o grau de hidrólise da caseína caprina foi mais elevado independente do tempo estudado (Tabela 1). É importante resaltar que o leite caprino e bovino tem grande homologia, principalmente em relação as suas proteínas, por exemplo, o alinhamento das sequências de aminoácidos da α_{s1} , α_{s2} , β e κ -caseína apresentam respectivamente semelhança de 88, 88, 91 e 85% entre as espécies (ZHANG et al., 2016).

Na Tabela 1, pode ser observado que o comportamento do grau de hidrólise dos caseinatos caprino e bovino aumentou em relação ao tempo. O caseinato bovino apresentou grau de hidrólise de 28,1% no tempo 24 horas, entretanto, este resultado não difere estatisticamente do tempo 8 horas (23,9%). Contudo, é provável que a enzima tenha encontrado maior disponibilidade de clivagem no caseinato caprino, dado que, o grau de hidrólise de 23,9% foi obtido no menor tempo avaliado para este. De modo geral, observou-se que o grau de hidrólise foi mais elevado para o caseinato caprino, variando entre 23,9 e 58,8%. Resultados semelhantes foram encontrados por Luo et al. (2014) em hidrolisados bovino produzidos através da enzima papaína durante 8 h, onde, o percentual de hidrólise foi 20,43%. Os autores avaliaram também a atuação das enzimas tripsina e pancreatina nos

mesmos intervalos de tempo. O grau de hidrólise entre os tempos analisados foi estatisticamente significativo para as três enzimas individualmente, e em todos os casos o melhor tempo de hidrólise foi 24 horas. A papaína foi ligeiramente mais eficiente dentre as três enzimas na hidrólise do caseinato bovino, apresentando GH de 22,06% após 24 horas. Neste contexto, Samaranayaka; Li-Chan, (2011) sugerem que quando a digestão de proteínas é realizada cogitando sequências peptídicas funcionais deve existir um estudo detalhado das condições experimentais envolvidas, uma vez que, parâmetros físico-químicos com pH, temperatura, tempo, enzima e substrato são fatores essenciais para produção específica destas moléculas.

Após aferição do grau de hidrólise e da confirmação dos resultados através da análise eletroforética tricina-SDS-PAGE (dados não mostrados), os hidrolisados foram fracionados individualmente em membrana de corte de 10 kDa e o permeado foi coletado para análises subsequentes. Segundo Korhonen; Pihlanto, (2006); Zhang et al., (2010); Samaranayaka; Li-Chan, (2011); Bezerra et al., (2013), a ultrafiltração é comumente empregada no fracionamento de peptídeos bioativos a partir de hidrolisados proteicos, membranas de corte são usadas para reter o conteúdo polipeptídico não digerido e as enzimas envolvidas na proteólise. Inclusive, o método tem sido muito eficiente viabilizando a obtenção de peptídeos antioxidantes a partir de hidrolisados da caseína caprina e de proteínas de soja.

Atividade sequestradora do ABTS^{•+} e DPPH[•]

Proteínas de alimentos quando submetidas à ação de proteases podem gerar hidrolisados contendo distintos peptídeos antioxidantes que podem atuar na promoção de saúde, já que estes podem evitar o desenvolvimento de doenças ligadas ao estresse oxidativo (HIDALGO et al., 2015). Frequentemente o DPPH[•] e o ABTS^{•+} são utilizados para avaliar *in vitro* o potencial antioxidante de hidrolisados proteicos e peptídeos, estes radicais são capazes

de receber um elétron ou átomos de hidrogênio tornando-se mais estáveis (CORRÊA et al., 2011; LI et al., 2013).

A capacidade antioxidante das frações peptídicas provenientes do caseinato caprino e bovino avaliadas através dos testes de eliminação dos radicais $ABTS^{++}$ e $DPPH^{\bullet}$, e da quelatação dos metais de transição cobre e ferro. Os hidrolisados caprino e bovino foram capazes de realizar o sequestro do $ABTS^{++}$, e o percentual de eliminação deste radical foi ascendente em relação ao tempo testado (Figura 1a). Os resultados observados nos hidrolisados caprino foram mais altos e estatisticamente distintos do bovino. No tratamento caprino não houve diferença significativa entre resultados apresentados nos tempos 2 e 4 horas, neste ensaio o tempo que apresentou maior concentração de peptídeos eliminadores de $ABTS^{++}$ foi 24 h (67,5%). Já nas frações peptídicas bovinas o sequestro do radical foi estatisticamente diferente entre todos os tempos avaliados no ensaio, apresentando maior potencial de eliminação no tempo 24 h (65,2%).

Em hidrolisados de soro de queijo de ovelha, Corrêa et al. (2014) observaram que a capacidade de eliminação do $ABTS^{++}$ também foi crescente em função do tempo de hidrólise, no entanto, os valores máximos foram atingidos após 6 h de hidrólise com o percentual de eliminação de 51,30%. Conforme Ahmed et al. (2015) o conteúdo peptídico encriptado nas estruturas primárias das caseínas no leite de cabra têm potencial antioxidante maior do que os derivados de proteínas do soro.

A eliminação do $DPPH^{\bullet}$ foi crescente em relação ao tempo de hidrólise do caseinato caprino (Figura 1b), apresentaram maior potencial no sequestro do radical as frações peptídicas que foram hidrolisadas por 24 h (11,8%). Porém, não houve diferença significativa no percentual de sequestro do $DPPH^{\bullet}$ dos hidrolisados obtidos com 8 e 24 h, tampouco, entre o 2 e 4 h. Nenhuma das frações peptídicas derivadas do caseinato bovino apresentaram habilidade de eliminar o radical $DPPH^{\bullet}$ nas condições testadas.

Neste contexto, Luo et al. (2014) constataram que tanto o caseinato sódico bovino, quanto seus hidrolisados exibiram baixa capacidade de eliminação do DPPH[•] quando incubados com o radical por 30 minutos, por isso aumentaram o período de incubação avaliando em diferentes intervalos de tempo (0,5, 1, 2, 4, 8, 24 h), concluindo que em 24 h os hidrolisados apresentaram maior aptidão no sequestro do radical. Os resultados sugerem que caseínas e seus hidrolisados têm capacidade limitada para doar elétrons quando a metodologia envolve curtos intervalos de interação da amostra com o radical. Segundo Corrêa et al. (2011), diferente do ABTS^{•+}, o DPPH[•] é insolúvel em água e por isso ele pode apresentar maior resistência ao tentar se difundir nas soluções aquosas, onde geralmente estão os peptídeos.

Atividade quelante de Fe²⁺ e Cu²⁺

A capacidade dos hidrolisados quelar o metal de transição cobre, aumentou conforme o tempo de hidrólise em ambas as espécies testadas (Figura 1c). Os peptídeos gerados a partir do caseinato caprino foram estatisticamente mais eficientes em quelar o Cu²⁺, do que os derivados do caseinato bovino, independente do tempo de hidrólise. Contudo, no tempo 24 h o percentual quelante dos hidrolisados caprino e bovino foram estatisticamente distintos dos outros tempos testados. É possível que neste intervalo de tempo tenham sido liberados das caseínas mais peptídeos aptos a quelar este metal de transição.

Em contrapartida, os hidrolisados de caseinato bovino foram mais eficientes e estatisticamente significantes como quelantes de Fe²⁺ (Figura 1d), e o percentual quelante dos tempos 2, 4 e 8 h não diferiram entre si. Todas as amostras experimentadas derivadas do caseinato caprino foram estatisticamente diferentes. Ademais, houve uma redução na capacidade dos hidrolisados do tempo 24 h, provenientes de ambas as espécies em sequestrar o íon Fe²⁺. Possivelmente a ação prolongada da protease na hidrólise do caseinato fragmentou as sequências peptídicas, ocasionando a inativando suas propriedades biológicas.

Segundo Zhang et al. (2010), a quelação de metais de transição como Cu^{2+} e Fe^{2+} retarda a peroxidação lipídica e como consequência impede modificações no sabor dos alimentos. Além do que, a peroxidação lipídica pode causar alterações nutricionais nos alimentos e acelerar sua deterioração (GÓMEZ-RUIZ et al., 2008). Hidrolisados de proteínas do leite ovino, caprino, bovino, de iaque e outros mamíferos que apresentam capacidade antioxidante podem ser utilizados como ingredientes funcionais nas indústrias de alimentos, a fim de aumentar seu valor nutricional, atuar na prevenção das reações de oxidação nos alimentos processados aumentando assim seu tempo de prateleira, e também, na saúde humana contra ações deletérias ocasionadas pelo estresse oxidativo (CORRÊA et al., 2011; MAO et al., 2011; BEZERRA et al., 2013; ESPEJO-CARPIO et al., 2013; GOBBA et al., 2014; LUO et al., 2014; AHMED et al., 2015).

Avaliação do potencial antimicrobiano

A habilidade dos hidrolisados do caseinato bovino e caprino (< 10 kDa), obtidos em diferentes tempos através da protease de *Acremonium* sp. L1-4B foi testada *in vitro* e os resultados exibidos na Tabela 2. Os hidrolisados bovino e caprino mostraram-se eficientes contra as bactérias Gram negativas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, em todos os tempos avaliados para a amostra caprina e bovina, exceto no tempo 2 h. Os hidrolisados 8 e 24 h caprino foram os únicos que inibiram a Gram positiva testada.

Arruda et al., (2012) detectaram no hidrolisado de caseína bovina obtido no tempo 2 h, atividade antimicrobiana frente *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Os autores ainda identificaram quatro peptídeos efetivos contra as mesmas cepas, todos resultantes da fragmentação da caseína α_1 (1-21), (1-23), (8-23) e (25-37) bovina. Enquanto Hidalgo et al. (2015) observaram que hidrolisados bovino obtidos nos tempos 0,5 e 1 h inibiram o

crescimento de *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 e *Listeria monocytogenes* ATCC 15131, ou seja, foram efetivos tanto contra bactérias Gram-positivas, quanto para Gram-negativas. Por espectrometria de massas os autores detectaram em seu hidrolisado, frações que constituem a α_1 -CN (1-10), α_1 -CN (9-24), α_1 -CN (9-25) e β -CN (190-209). Por outro lado, Corrêa et al. (2011) notaram que o hidrolisado do caseinato ovino (tempo 3 h), foi capaz de inibir o crescimento das bactérias Gram positivas (*Bacillus cereus* ATCC 9634 e *Corynebacterium fimi* NCTC 7547), porém, não foram deletérios contra nenhuma das Gram negativas testadas. É sabido que bactérias Gram negativas possuem o envelope celular com arranjo mais complexo do que as Gram positivas, todavia, pouco se sabe sobre composição, aparatos e formas de atuação dos peptídeos antimicrobianos, de modo que, muitas características precisam ser analisadas, desde a massa molecular, o arranjo de aminoácidos na sequência e até mesmo a espécie bacteriana experimentada (LIMA et al., 2015).

Avaliação do potencial anti-hipertensivo

Todos os hidrolisados bovino e caprino apresentaram habilidade de inibir a enzima conversora de angiotensina (Tabela 1). Nas amostras provenientes da hidrólise do caseinato bovino é possível observar que não houve diferença significativa entre os resultados dos tempos 2, 4 e 8 horas. No entanto, os resultados de inibição da ECA por hidrolisados caprino mostraram que o tempo 8 horas foi o melhor, apresentando 75,0% de inibição da enzima conversora de angiotensina e sendo este percentual estatisticamente distinto dos demais.

Resultados similares foram encontrados por Luo et al. (2014) em hidrolisados de caseinato bovino produzidos por ação da papaína durante 24 h, onde houve inibição de ECA em torno de 65%. Espejo-Carpio et al. (2013) hidrolisou caseínas e proteínas do soro do leite caprino com subtilisina, tripsina e com ambas enzimas simultaneamente, durante 3 h a 50 °C. O percentual de inibição da ECA dos hidrolisados variou entre 30 e 65%. A maior inibição foi

constatada nos hidrolisados em que a combinação de subtilisina e tripsina foi usada, essa tendência foi observada para todos os substratos testados. Os autores verificaram que grande parte dos peptídeos inibidores de ECA tinham massa molecular <2 kDa, dentre eles, foi identificado um dipeptídeo muito hidrofóbico com maior potencial, de modo que a utilização de membranas pode facilitar a concentração e purificação destes.

Identificação do perfil peptídico por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF)

As amostras dos hidrolisados bovino e caprino obtidas no tempo de hidrólise 8 h (< 10 kDa) apresentaram características atrativas nos ensaios de bioatividade, por isso foram eleitas para prospecção peptídica por MS/Ms. Um total de 23 sequências peptídicas distintas foram detectadas na amostra bovina (Tabela 3), e 31 na caprina (Tabela 4), utilizando o software Biotoools combinado com o MASCOT. É interessante observar nas Tabelas 3 e 4, que a massa experimental variou entre 897,54 e 3024,64 Da, enquanto a calculada dentre 897,54 e 3023,63 Da para o hidrolisado bovino. E no caprino as massas experimental e calculada estiveram entre 897,55 e 2231,13 Da, e dentre 897,54 e 2230,13 Da, respectivamente.

O tamanho, conteúdo de aminoácidos e seus arranjos na sequência são condições determinantes da bioatividade dos peptídeos derivados de proteínas do leite, um mesmo peptídeo pode oferecer distintas atividades biológicas, ademais sequências que apresentam de 2 a 20 resíduos comumente são mais ativas (KORHONEN, 2009).

Neste estudo a proteólise do caseinato bovino foi eficiente na liberação de sequências funcionais que estavam encriptadas na α_{S1} e β caseína (Tabela 3), muitas das sequências detectadas são idênticas a algumas já relatadas na literatura como bioativas.

Por exemplo, o peptídeo Gly-Leu-Pro-Gln-Glu-Val-Leu-Asn-Glu-Asn-Leu-Leu-Arg já havia sido descrito por Arruda et al. (2012) com potencial antimicrobiano de amplo espectro, efetivo contra *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Outras sequências identificadas

(Tabela 3) foram descritas na literatura como inibidoras da enzima conversora de angiotensina, como por exemplo, a Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn (EISELE et al., 2013; PETRAT-MELIN et al., 2017). Tavares et al. (2011) apontam que Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu também possui as mesmas propriedades e reforça que o peptídeo quando submetido a digestão gastrointestinal *in vitro* não permaneceu íntegro, porém, continuou inibindo a ECA. Ademais, Asano et al. (1992) indicam que o octapeptídeo Ile-His-Pro-Phe-Ala-Gln-Thr-Gln é inibidor de prolil endopeptidase, enzima também envolvida no sistema de regulação cardiovascular. Eisele et al. (2013) afirmam que Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn é um potente antioxidante com valor de IC_{50} 6,2 μ M.

Foi verificado que o hidrolisado caprino (tempo 8 h) continha uma mistura complexa de peptídeos de tamanhos distintos, no entanto todos derivados da sequência primária da β caseína (Tabela 4). Das sequências identificadas por espectrometria de massas algumas bioativas já são conhecidas e serão exemplificadas aqui.

Dentre estas podemos destacar a Leu-Gln-Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe que é um octapéptido derivado de β -caseína caprina identificado por Ahmed et al. (2015), e que é capaz de eliminar os radicais superóxido O_2^- e DPPH $^{\bullet}$, sendo assinalado como potente antioxidante. Ademais, Bezerra et al. (2013) associaram a três peptídeos a atividade sequestradora do radical ABTS $^{+}$, dentre eles Leu-Leu-Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val. Quirós et al. (2005) detectaram atividade inibidora de ECA em peptídeos derivados de Kefir caprino, dentre eles os Gly-Val-Pro-Lys-Val-Lys-Glu-Thr-Met-Val-Pro-Lys e Gly-Val-Pro-Lys-Val-Lys-Glu-Thr-Met-Val-Pro-Lys-His ambos precursores de β -caseína apresentaram valor de IC_{50} 376,1 e 223,2 μ M, respectivamente. O octapeptídeo Met-His-Gln-Pro-Pro-Gln-Pro-Leu é capaz de inibir a dipeptidil peptidase 4, apresenta IC_{50} de 350,41 μ M, inibidores desta enzima podem ser utilizados na prevenção ou na ação terapêutica coadjuvante para o tratamento da diabetes tipo 2 (ZHANG et al., 2015).

As atividades biológicas detectadas *in vitro* neste estudo podem estar relacionadas a estes peptídeos descritos anteriormente na literatura e apresentados nesta discussão. No entanto, é importante resaltar que a clivagem induzida pela protease de *Acremonium* sp. L1-4B originou sequências desconhecidas que podem ser responsáveis por essas bioatividades de modo individual ou por ação sinérgica, contudo, para confirmação desta hipótese novas pesquisas precisam ser realizadas com esses.

CONCLUSÃO

Os hidrolisados dos caseinatos caprino e bovino, produzidos por ação da protease de *Acremonium* sp. L1-4B foram hábeis na eliminação de radicais livres e na quelação de metais de transição. Inibiram a enzima conversora de angiotensina e o crescimento de bactérias patogênicas. As atividades biológicas identificadas nos hidrolisados podem ser resultantes da ação de diferentes peptídeos bioativos contidos na mistura; sugere-se que novos estudos sejam realizados para purificar e elucidar a estrutura, funcionalidade e toxicidade de cada uma das sequências, para que assim, elas possam ser incorporadas a alimentos funcionais ou até mesmo na indústria farmacêutica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE IBPG-0626-5.05/12), à Fundação Estadual de Pesquisa de São Paulo (FAPESP 2010/17033-0 e 2013/19486-0), a CAPES (PROCAD NF 717/2010), e a Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio financeiro e estrutural.

REFERÊNCIAS

Abidi, F, Chobertb, JM, Haertléb, T and Marzoukia, MN, Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. *Process Biochem* **46**:2301-2310 (2011).

Adler-Nissen J, Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by

trinitrobenzenesulfonic acid. *J Agric Food Chem* **27**:1256-1262 (1970).

Agyei D and Danquah MK, Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnol Adv* **29**: 272-277 (2011).

Agyei D, Ongkudonb CM, Wei CY, Chan AS and Danquah MK, Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food Bioprod Process* **98**:244-256 (2016).

Ahmed AS, El-Bassiony T, Elmal LM and Ibrahim HR, Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. *Food Res Int* **74**:80-88 (2015).

Alves CQ, David JM, David JP, Bahia MV and Aguiar RM, Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Quim Nova* **33**: 2202-2210 (2010).

Arruda MS, Silva FO, Egito AS, Silva TMS, Lima-Filho JL, Porto ALF *et al.*, New peptides obtained by hydrolysis of caseins from bovine milk by protease extracted from the latex *Jacaratia corumbensis*. *LWT - Food Sci Technol* **49**:73-79 (2012).

Asano M, Nio N and AriyoshiY, Inhibition of Prolyl Endopeptidase by Synthetic β -Casein Peptides and Their Derivatives with a C-Terminal Prolinol or Prolinal. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**:976-977 (1992).

Bezerra VS, Campos JF, Silva RA, Porto TS, Lima-Filho JL and Porto ALF, Biotechnological richness of the northeastern semi-arid region: antioxidant activity of casein hydrolysates from Moxotó goat milk (*Capra hircus Linnaeus*, 1758) obtained by papain action. *Food Sci Technol* **33**:513-520 (2013).

Charney J and Tomarelli RM, A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J Biol Chem* **170**:501-505 (1947).

Corrêa APF, Daroit DJ, Coelho JG, Meira SMM, Lopes FC, Segalin J *et al.*, Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *J Sci Food Agric* **91**: 2247-54 (2011).

Corrêa, APF, Daroit DJ, Fontoura R, Meira SMM, Segalina J and Brandelli A, Hydrolysates

of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides* **61**:48-55 (2014).

Cushman DW and Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* **20**:1637-1648 (1971).

Danquah MK and Agyei D, Pharmaceutical applications of bioactive peptides. *OA Biotechnol* **1**:1-7 (2012).

Egito AS, Rosinha GMS, Laguna LE, Miclo L, Girardier JM and Gaillard JL, Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. *Arq Bras Med Vet Zootec* **58**: 932-939 (2006).

Eisele T, Stressler T, Kranz B and Fischer L, Bioactive peptides generated in an enzyme membrane reactor using *Bacillus lentus* alkaline peptidase. *Eur Food Res Technol* **236**:483-490 (2013).

Gobba C, Tompa G and Otte J, Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolysed by two commercial proteases. *Int Dairy J* **39**:28-40 (2014).

Hidalgo ME, Côrrea APF, Canales MM, Daroit DJ, Brandelli A and Risso P. Biological and physicochemical properties of bovine sodium caseinate hydrolysates obtained by a bacterial protease preparation. *Food Hydrocoll* **43**:510-520 (2015).

Jäkälä P and Vapaatalo H, Antihypertensive Peptides from Milk Proteins. *Pharmaceuticals* **3**:251-272 (2010).

Korhonen H and Pihlanto A, Bioactive peptides: Production and functionality. *Int Dairy J* **16**:945-960 (2006).

Korhonen H, Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *J Funct Foods* **1**:177-187 (2009).

Lario LD, Chaud L, Almeida Md, Converti A, Sette LD and Pessoa AJr, Production, purification, and characterization of extracellular acid protease from the marine Antarctic

- yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. *Fungal Biol* **119**:1129-1136 (2015).
- Li J, Yang J, Huang X and Zhang KQ, Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. *Process Biochem* **41**:925-929 (2006).
- Li Z, Jiang A, Yue T, Wang J, Wang Y and Su J, purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. *J Dairy Sci* **96**:4242-4251 (2013).
- Lima CA, Campos JF, Filho JL, Converti A, Cunha MG and Porto AL, Antimicrobial and radical scavenging properties of bovine collagen hydrolysates produced by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 collagenase. *J Food Sci Tech* **52**:4459-4466. 2015.
- Luo Y, Pan K and Zhong Q, Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: Partial characterizations. *Food Chem* **15**:5146-5154 (2014).
- Mao XY, Cheng X., Wang X and Wu SJ, Free-radical-scavenging and anti-inflammatory effect of yak milk casein before and after enzymatic hydrolysis. *Food Chem* **126**:484-490 (2011).
- Mohanty DP, Mohapatra S, Misra S and Sahu PS, Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Saudi J Biol Sci* **23**:577-583 (2016).
- Nascimento TCES, Sena AR, Gomes JEG, Santos WL, Montalvo GSA, Tambourgi EB *et al.*, Extracellular serine proteases by *Acremonium* sp. L1-4B isolated from Antarctica: Overproduction using cactus pear extract with response surface methodology. *Biocatal Agric Biotechnol* **4**:737-744 (2015).
- Petrat-Melin B, Le TT, Møller HS, Larsen LB and Young J.F, Inhibition of angiotensin 1-converting enzyme by peptides derived from variants of bovine β -casein upon apical exposure to a Caco-2 cell monolayer. *J Dairy Sci* **100**:1-5 (2017).
- Quirós A, Hernández-Ledesma B, Ramos M, Amigo L and Recio I. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptides Derived from Caprine Kefir. *J Dairy Sci* **88**:3480-

3487 (2005).

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (2015). URL <https://www.R-project.org/>.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M and Rice-Evans C, Antioxidant activity applying an improved ABTS⁺⁺ radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* **26**:1231-1237 (1999).

Samaranayaka AGP and Li-Chan ECY, Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *J Funct Foods*, **3**:229-254 (2011).

Sánchez-Vioque R, Polissiou M, Astraka K, Mozos-Pascual M, Tarantilis P and Herraiz-Peñalver D, *et al.*, Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. *Ind Crops Prod* **49**:150-159 (2013).

Schägger H, Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* **1**:16-22 (2006).

Tavares T, Contreras MDM, Amorim M, Pintado M, Recio I and Malcata FX, Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: In vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes. *Peptides*. **32**:1013-1019 (2011).

Wu S, Qi W, Li T, Lu D, Su R and He Z, Simultaneous production of multi-functional peptides by pancreatic hydrolysis of bovine casein in an enzymatic membrane reactor via combinational chromatography. *Food Chem* **141**:2944-2951 (2013).

Zhang C, Cao W, Hong P, Ji H, Qin X and He J, Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of *Acetes chinensis* peptic hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Int J Food Sci Tech*, **44**:2042-2048 (2009).

Zhang L, Li J and Zhou K, Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. *Bioresour Technol* **101**:2084-2089 (2010).

Zhang Y, Chen R, Ma H and Chen S, Isolation and identification of dipeptidyl peptidase IV-

Inhibitory peptides from Trypsin/Chymotrypsin-treated goat milk casein hydrolysates by 2D-TLC and LC-MS/MS. *J Agric Food Chem* **63**:8819-8828 (2015).

Zhang Y, Chen R, Zuo F, Ma H, Zhang Y and Chen S, Comparison of dipeptidyl peptidase IV-inhibitory activity of peptides from bovine and caprine milk casein by in silico and in vitro analyses. *J Dairy Sci* **53**:37-44 (2016).

TABELAS

Tabela 1. Grau de hidrólise dos caseinatos caprino e bovino em função do tempo e atividade inibitória de ECA dos hidrolisados obtidos a partir da protease de *Acremonium* sp. L1-4B.

Tempo (h)	Grau de Hidrólise (%)		Atividade inibitória de ECA (%)	
	Bovino	Caprino	Bovino	Caprino
2	9,5±2,7 ^{cB}	23,9±2,7 ^{cA}	32,5±4,3 ^{aB}	62,5±4,3 ^{bcA}
4	18,4±0,6 ^{bB}	31,8±0,4 ^{bcA}	37,4±2,7 ^{aB}	65,7±2,7 ^{bA}
8	23,9±2,2 ^{abB}	40,3±0,9 ^{bA}	43,7±2,4 ^{aB}	75,0±2,4 ^{aA}
24	28,1±3,5 ^{aB}	58,8±10,5 ^{aA}	2,2±0,9 ^{bB}	56,0±0,3 ^{cA}

Valores médios ± desvio padrão ($n = 3$); As letras minúsculas em coluna, e as letras maiúsculas em linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 2. Atividade antimicrobiana dos hidrolisados de caseinato caprino e bovino obtidos a partir da protease de *Acremonium* sp. L1-4B, contra bactérias Gram-negativas e Gram-positiva, onde, os símbolos (+) indicam a presença e (-) ausência da inibição do crescimento microbiano.

Hidrolisados	Micro-organismos	Tempo (h)			
		2	4	8	24
Bovino	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	+	+	+	+
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-
	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	-	+	+	+
Caprino	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	+	+	+	+
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	+	+
	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	+	+	+	+

Tabela 3. Peptídeos identificados por espectrometria de massas (MS/MS) na fração <10 kDa proveniente da hidrólise de caseína bovina por protease de *Acremonium* sp. L1-4B (tempo 8 h).

Sequência	Identidade peptídica ^a	Massa	Massa	Score ^b
		Experimental	Calculada	
		(Da)	(Da)	
GLPQEVLENLLR	α_{S1} -caseína (25-37)	1493,83	1493,82	27
ENLLRFF	α_{S1} -caseína (33-39)	937,50	937,50	37
VAPFPEVFGK	α_{S1} -caseína (40-49)	1089,59	1089,59	70
VAPFPEVFGKEK	α_{S1} -caseína (40-51)	1346,72	1346,72	37
VAPFPEVFGKEKV	α_{S1} -caseína (40-52)	1445,79	1445,79	27
VAPFPEVFGKEKVN	α_{S1} -caseína (40-53)	1559,83	1559,83	33
LEQLRLRK	α_{S1} -caseína (110-117)	1011,64	1011,64	45
KYKVPQLEIVPN	α_{S1} -caseína (118-129)	1426,82	1426,82	29
PIGSENSEKTTMPLW	α_{S1} -caseína (200-214)	1688,81	1688,81	53
SENSEKTTMPLW	α_{S1} -caseína (200-214)	1421,65	1421,65	3
SEKTTMPLW	α_{S1} -caseína (200-214)	1091,53	1091,53	21
RELEEL	β -caseína (16-21)	787,41	787,41	29
RELEELN	β -caseína (16-22)	901,45	901,45	28
ELQDKIHPF	β -caseína (59-67)	1125,58	1125,58	20
IHPFAQTQ	β -caseína (64-71)	940,48	940,48	37
SLVYPFPGPIP	β -caseína (72-83)	1299,69	1299,69	10
VYPFPGPIP	β -caseína (74-83)	1099,57	1099,57	5
PEVMGVSKVK*	β -caseína (105-114)	1089,59	1088,59	6
SLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAF	β -caseína (179-205)	3024,64	3023,63	10
SQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAF	β -caseína (181-205)	2824,52	2823,51	17

Continua...

Sequência	Identidade peptídica ^a	Massa	Massa	Score ^b
		Experimental	Calculada	
		(Da)	(Da)	
SQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAF*	<i>β-caseína (181-205)</i>	2840,50	2839,51	15
RDMPIQAF	<i>β-caseína (198-205)</i>	976,48	976,48	38
RGPFPIIV	<i>β-caseína (217-224)</i>	897,54	897,54	40

^a Os números referem-se às posições dos aminoácidos na sequência da proteína; ^b O score é uma medida da significância estatística de um match (Mascot);* + Oxidação (M); Em negrito sequências encontradas no estudo e também exibidas na literatura como bioativa.

Tabela 4. Peptídeos identificados por espectrometria de massas (MS/MS) na fração <10 kDa proveniente da hidrólise de caseína caprina por protease de *Acremonium* sp. L1-4B (tempo 8 h).

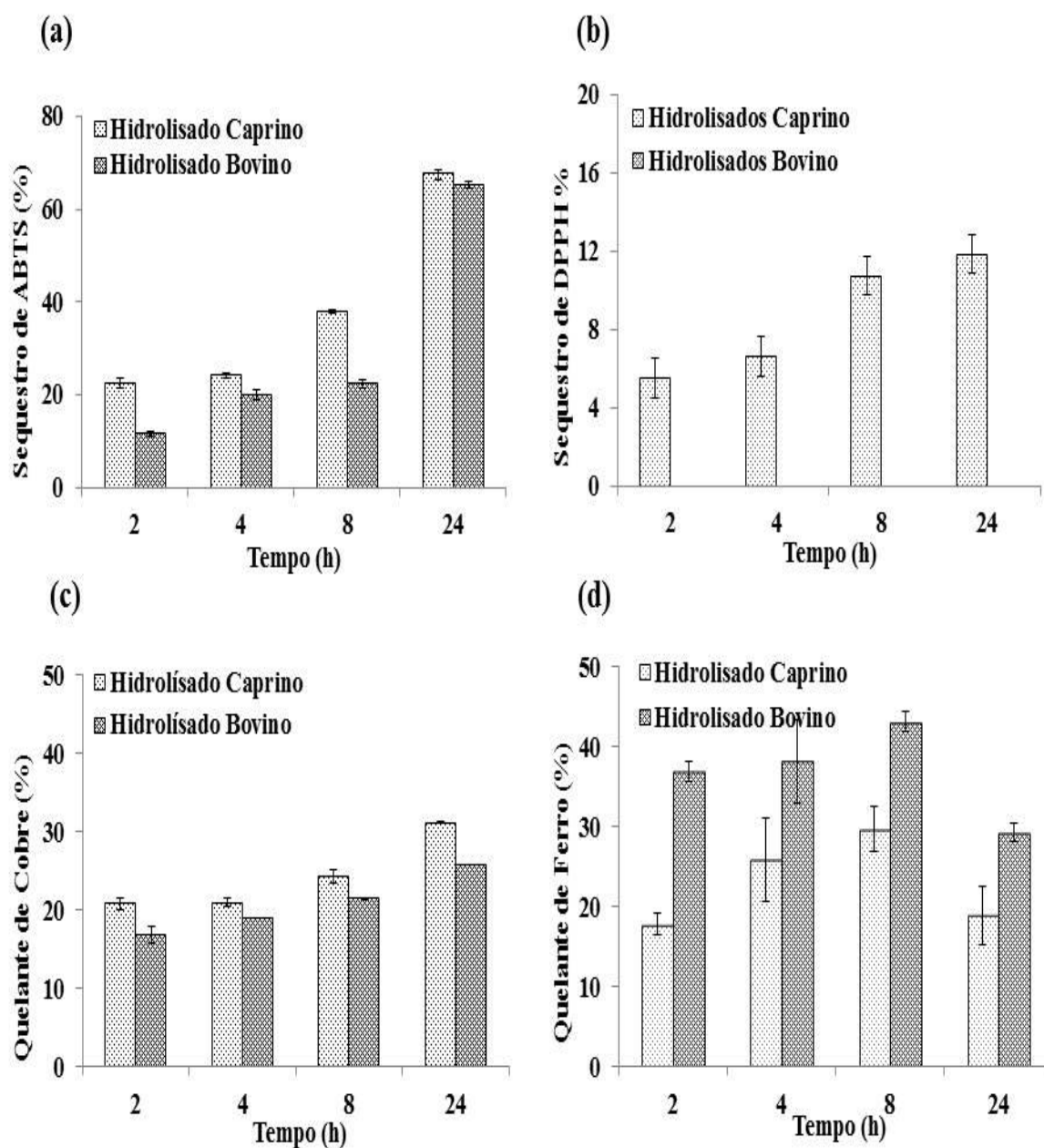
Sequência	Identidade peptídica ^a	Massa	Massa	Score ^b
		Experimental	Calculada	
		(Da)	(Da)	
REQEELNV	β -caseína (16-23)	1015,49	1015,49	35
REQEELNVVGE	β -caseína (16-26)	1300,62	1300,63	39
LQDKIHPP	β -caseína (60-67)	996,54	996,54	30
LQDKIHPPFAQAQ	β -caseína (60-71)	1394,73	1394,73	17
IHPFAQAQ	β -caseína (64-71)	910,47	910,47	33
AQSLVYPFTGPIPN	β -caseína (70-83)	1502,78	1502,78	2
SLVYPFTGPIPN	β -caseína (72-83)	1303,69	1303,68	10
SLVYPFTGPIPNSLPQN	β -caseína (72-88)	1843,96	1842,95	47
VYPFTGPIPNSLPQN	β -caseína (74-88)	1642,84	1642,84	35
GVPKVKETMVPK	β -caseína (109-120)	1311,76	1311,76	49
GVPKVKETMVPK*	β -caseína (109-120)	1327,75	1327,75	28
GVPKVKETMVPKH	β -caseína (109-121)	1448,82	1448,82	26
HKEMPPFKYPVEPFTESQ	β -caseína (121-138)	2190,04	2190,05	7
SLTLTDVEK	β -caseína (139-147)	1004,54	1004,54	17
HLPLPLVQ	β -caseína (149-156)	915,56	915,55	44
SWMHQPPQPLSPT	β -caseína (157-169)	1504,72	1504,71	11
MHQPPQPL	β -caseína (159-166)	946,47	946,47	29
MHQPPQPLSPT	β -caseína (159-169)	1231,60	1231,60	22
MHQPPQPLSPT*	β -caseína (159-169)	1247,59	1247,60	17
MHQPPQPLSPTVMFPPQSVL	β -caseína (159-178)	2231,13	2230,13	18

Continua...

Sequência	Identidade peptídica ^a	Massa	Massa	Score ^b
		Experimental (Da)	Calculada (Da)	
SLSQPKVLPVPQ	<i>β-caseína (179-190)</i>	1291,75	1291,75	18
SLSQPKVLPVPQK	<i>β-caseína (179-191)</i>	1419,84	1419,84	34
LSQPKVLPVPQK	<i>β-caseína (180-191)</i>	1332,81	1332,81	34
SQPKVLPVPQ	<i>β-caseína (181-190)</i>	1091,63	1091,63	28
SQPKVLPVPQK	<i>β-caseína (181-191)</i>	1219,73	1219,73	20
KVLPVPQKAVPQ	<i>β-caseína (184-195)</i>	1302,79	1302,80	2
RDMPIQAF	<i>β-caseína (196-203)</i>	976,48	976,48	46
RDMPIQAF*	<i>β-caseína (196-203)</i>	992,48	992,47	41
LLYQEPVLGPV	<i>β-caseína (204-214)</i>	1226,69	1226,69	16
LGPVRGPFILV	<i>β-caseína (211-222)</i>	1263,78	1263,77	11
RGPFILV	<i>β-caseína (215-222)</i>	897,55	897,54	47

^a Os números referem-se às posições dos aminoácidos na sequência da proteína; ^b O score é uma medida da significância estatística de um match (Mascot); * + Oxidação (M); Em negrito sequências encontradas no estudo e também exibidas na literatura como bioativa.

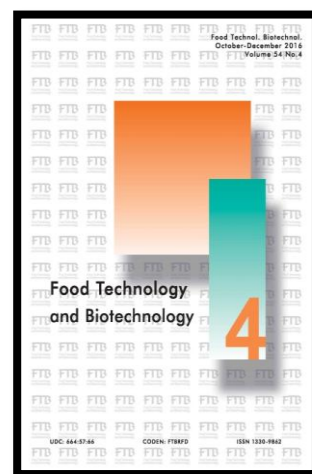
Figura 1. Avaliação da atividade antioxidante dos hidrolisados de caseinato caprino e bovino obtidos através da protease de *Acremonium* sp. L1-4B; testes de sequestro do radical ABTS^{•+} (a), DPPH[•] (b), habilidade de quelação dos íons metálicos cobre (c) e ferro (d).



CAPÍTULO III

Atividade antioxidante de hidrolisados de caseinato bovino obtidos a partir da protease produzida por *Geomyces pannorum* S2B

A ser submetido à revista:



Food Technology and Biotechnology

ISSN: 1330-9862

Guia para autores disponível em:

<http://www.ftb.com.hr/index.php/info-for-authors/manuscript-organization>

Atividade antioxidante de hidrolisados de caseinato bovino obtidos a partir da protease produzida por *Geomyces pannorum* S2B

Título breve: Hidrolisados do caseinato bovino com potencial antioxidante

Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento¹; Wellington Leal dos Santos¹; Amanda Reges de Sena²; Gualberto Segundo Agamez Montalvo³; Lara Durães Sette⁴; João Vitor Dutra Molino⁵; Adalberto Pessoa Júnior⁵; Keila Aparecida Moreira^{6*}

¹Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Pernambuco, Brasil. E-mail: talitacamila07@gmail.com; wellingtonleal16@gmail.com

²Laboratório de Microbiologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco. Pernambuco, Brasil. E-mail: amandareges@gmail.com

³Instituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo, São Paulo. Brasil. E-mail: gsagamez@gmail.com

⁴Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Universidade do Estado de São Paulo. São Paulo, Brasil. E-mail: larasette@rc.unesp.br

⁵Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil. E-mail: candidomolino@gmail.com; peessoajr@usp.br

⁶Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Pernambuco, Brasil. E-mail: moreirakeila@hotmail.com

***Autor de Correspondência:** moreirakeila@hotmail.com

Tel: +55 (87) 37645520 ou +55 (87) 92433912.

Atividade antioxidante de hidrolisados de caseinato bovino obtidos a partir da protease produzida por *Geomyces pannorum* S2B

Resumo

Proteases clivam ligações peptídicas das proteínas em peptídeos e aminoácidos, beneficiando vários segmentos industriais. Quando produzidas a partir de extremófilos enzimas podem apresentar características distintas resultantes das modificações estruturais destes organismos. No estudo foram selecionados parâmetros visando aumentar a produção de proteases a partir de *Geomyces pannorum* S2B isolado da Antártica e consequentemente aplicar a enzima parcialmente purificada para obter hidrolisados de caseinato bovino com potencial antioxidante. O planejamento Plackett-Burman foi usado para selecionar as variáveis significantes na produção de proteases por fermentação submersa de *G. pannorum* S2B na temperatura de 14 °C. Ureia, sulfato de amônio, glicose e sulfato de magnésio apresentaram efeitos significativos e com estas variáveis foi construído um Delineamento Composto Central, avaliado através da Metodologia de Superfície de Resposta e a protease foi aplicada na hidrólise do caseinato sódico bovino em diferentes temperaturas de incubação (5, 10, 20, 30, 40 °C). O uso de ferramentas estatísticas promoveu um aumento expressivo na produção da enzima, que apresentou aptidão na hidrólise da caseína em todas as temperaturas testadas. Os hidrolisados (< 10 kDa) apresentaram potencial para o sequestro dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, bem como, na quelação de cobre e ferro. O trabalho apresenta uma combinação de métodos experimentais que aumentou a produção de uma protease apta a gerar hidrolisados de caseinato bovino com capacidade antioxidante que podem ser úteis na indústria de alimentos nutraceuticos.

Palavras-chave: Psicrófilos; Enzimas proteolíticas; Planejamento experimental; Caseína bovina.

Antioxidant activity of bovine caseinate hydrolysates obtained from the protease produced by *Geomyces pannorum* S2B

Abstract

Proteases cleave peptide bonds of proteins into peptides and amino acids, benefiting various industrial segments. When produced from extremophiles, enzymes may exhibit distinct characteristics resulting from the structural modifications of these organisms. In the study, parameters were selected to increase the production of proteases from *Geomyces pannorum* S2B isolated from Antarctica and consequently to apply the partially purified enzyme to obtain bovine caseinate hydrolysates with antioxidant potential. Plackett-Burman planning was used to select the significant variables in the production of proteases by submerged fermentation of *G. pannorum* S2B at a temperature of 14°C. Urea, ammonium sulfate, glucose and magnesium sulfate presented significant effects and with these variables a Central Compound Design was constructed, evaluated through the Response Surface Methodology and the protease was applied in the hydrolysis of bovine sodium caseinate at different incubation temperatures (5, 10, 20, 30, 40°C). The use of statistical tools promoted an expressive increase in enzyme production, which showed suitability for casein hydrolysis at all tested temperatures. Hydrolysates (< 10 kDa) showed potential for the sequestration of the radicals DPPH[•] and ABTS^{•+}, as well as in the chelation of copper and iron. The paper presents a combination of methods which increase the production of a protease able to generate hydrolysed of caseinate bovine with antioxidant capacity that may be useful in the nutraceutical food industry.

Keywords: Psychophils; Proteolytic enzymes; Experimental design; Bovine casein.

INTRODUÇÃO

A utilização sequencial de distintos planejamentos estatísticos é uma estratégia que possibilita selecionar e estabelecer condições ótimas para produção de biomoléculas. Os planejamentos Plackett-Burman são eficientes no desenvolvimento de estudos prévios, uma vez que possibilitam selecionar a partir de um número amplo de variáveis. Enquanto a Metodologia de Superfície de Resposta permite identificar dentro de um sistema multivariável os níveis ótimos de cada fator, suas interações e seus efeitos (REDDY et al., 2008; MOHAN et al., 2014).

Proteases são enzimas que hidrolisam proteínas convertendo-as em peptídeos e aminoácidos. Comumente empregadas na indústria farmacêutica, de alimentos, detergentes, no tratamento de resíduos e depilação de couro (SHANKAR et al., 2011; LI et al., 2013a; SOUZA et al., 2015). A proteólise é utilizada como instrumento indispensável na tecnologia de alimentos para transformação de proteínas, modificando características de sabor, solubilização, emulsificação, gelificação e também na obtenção de peptídeos bioativos, uma vez que, algumas sequências resultantes da fragmentação proteica tem capacidade de atuar fisiologicamente no corpo humano (TAVANO, 2013; CASTRO; SATO, 2015).

Proteínas do leite são ingredientes excepcionais dentre os alimentos funcionais, detentoras de diversas sequências peptídicas biogênicas que permanecem inativas na sua cadeia intacta, porém, que podem ser desprendidas por ação de enzimas, através da fermentação por cepas proteolíticas e por digestão gastrointestinal. Já foram demonstradas *in vitro* e *in vivo* as atividades multifuncionais de peptídeos provenientes de proteínas do leite, no entanto, pouco se sabe sobre seus mecanismos de ação. Apontados como promotores de saúde que podem agir benéficamente na fisiologia do sistema nervoso, imune, endócrino, digestório e cardiovascular, oferecendo para indústria de laticínios um enfoque promissor fundamentado na dieta e saúde (KORHONEN, 2009; PHELAN et al., 2009).

Neste sentido, objetivou-se aumentar a produção de proteases por fermentação submersa a partir do fungo filamentoso *Geomyces pannorum* S2B de origem marinha isolado da Antártica, purificar parcialmente a enzima e empregar na hidrólise de caseína bovina para obter hidrolisados com potencial antioxidante.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

Ácido tricloroacético (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); ABTS (2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico); acrilamida; azocaseína; bis-acrilamida; caseinato sódico de leite bovino; TNBS (2,4,6-ácido trinitrobenzenosulfônico); DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil); ferrozina (3-(2-Piridil)-5,6-bis (4-ácido Fenil Sulfônico)-1,2,4, triazina); persulfato de amônio; violeta de pirocatecol; TEMED (N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina.); tricina (N-[Tris(hidroximetil)metil]glicina); tris (2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol); ureia (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Hidróxido de potássio (Química Moderna, São Paulo, Brasil). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Micro-organismo

O fungo filamentoso *Geomyces pannorum* S2B, isolado a partir de amostra de *Salpa* sp. do mar Antártico, foi cedido pela Divisão de Recursos Microbianos da Universidade de Campinas (DRM/UNICAMP). A linhagem foi reativada em meio de cultivo Batata Dextrose Ágar na temperatura de 15 °C, por 240 horas. O inóculo foi padronizado em solução contendo NaCl (0,3%) e Tween 80 (0,9%) em 10⁶ conídios mL⁻¹. Todos os ensaios do processo fermentativo submerso ocorreram em frascos tipo Erlenmeyer com capacidade de 125 mL, contendo 25 mL de meio. As condições fixas durante a fermentação foram 14 °C, agitação orbital de 120 rpm e duração de 144 horas, estes parâmetros foram estabelecidos a partir de estudos prévios.

Planejamento Plackett-Burman

O planejamento segundo Plackett-Burman (1946) foi empregado a fim de selecionar, dentre 11 variáveis, quais as significativas na produção de proteases por *G. pannorum* S2B. Nomeadamente foram avaliadas as concentrações de farelo de trigo, torta de algodão, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de levedura, peptona, triptona, ureia, glicose, MgSO_4 , CaCl_2 e NaCl , em dois níveis: +1 e -1 (Tabela 1), totalizando 16 ensaios experimentais realizados em único bloco em ordem aleatória.

Delineamento Composto Central e Metodologia de Superfície de Resposta

O Delineamento Composto Central foi utilizado com a finalidade de maximizar a produção de proteases. Este novo delineamento foi desenhado a partir das variáveis significativas resultantes do planejamento anterior. As variáveis foram analisadas em cinco níveis ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$), contendo seis repetições do ponto central, totalizando 30 ensaios (Tabela 2). A Metodologia de Superfície de Resposta foi aplicada para observar a tendência da produção e assim definir o conjunto de parâmetros e níveis que promovem o aumento da produção enzimática.

Validação do modelo

Com o intuito de validar a composição do meio para a produção de proteases por *G. pannorum* S2B, foram realizados três experimentos adicionais nas condições previstas pelo modelo, sendo a média de atividade proteásica resultante dos ensaios utilizada no estudo comparativo.

Atividade proteásica

A quantificação da protease foi realizada de acordo com a metodologia de Charney e Tomarelli (1947) com adaptações. Os tubos testes foram preparados com 250 μL de extrato enzimático, 250 μL de azocaseína 0,5% (m/v) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. A mistura reacional foi incubada por 40 minutos a 37 °C e a reação interrompida por adição de

250 μ L de ácido tricloroacético 10% (m/v). Centrifugada a 4000 $\times g$ durante 10 minutos a 4 °C, logo, 500 μ L do sobrenadante foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 500 μ L de KOH 0,5 M (m/v), e absorbância mensurada a 430 nm. Uma unidade (U) de protease foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,001 por minuto.

Determinação das proteínas totais

A determinação do conteúdo de proteínas totais foi realizada utilizando o kit de ensaio de proteínas BCA (ácido bicinconínico) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Soro albumina bovina em diferentes concentrações (100 - 1000 μ g) utilizada como proteína padrão.

Purificação parcial

A enzima proveniente da validação do modelo foi liofilizada e estocada a -20 °C para ser utilizada nos ensaios de purificação. A protease de *G. pannorum* S2B foi solubilizada no tampão tris-HCl 20 mM, pH 8,0 e submetida a precipitação com 70% de acetona durante 30 minutos à 4 °C, centrifugada por 20 minutos (4000 $\times g$, 4 °C). O precipitado foi ressuspensionado no volume inicial com tampão tris-HCl 20 mM, pH 8,0, contendo glicina 100 mM e a amostra foi aplicada na coluna de exclusão molecular Superdex™ 200 Increase 10/300 (GE Healthcare, Uppsala, Suíça), acoplada ao sistema ÄKTA™ FPLC™ (GE Healthcare, Uppsala, Suíça). A purificação ocorreu em fluxo de fase móvel de 1 mL min⁻¹ e foram coletadas frações de 1,0 mL, congeladas -20 °C até sua utilização.

Hidrólise do caseinato sódico bovino

O caseinato sódico bovino (10 mg mL⁻¹) foi solubilizado em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5. A reação foi iniciada por adição da protease de *G. pannorum* S2B na proporção de 1:50 (v/v) enzima: substrato. A hidrólise do caseinato ocorreu durante 3 horas em banho termostaticado nas temperaturas de 5, 10, 20, 30 e 40 °C, sendo interrompida a 100 °C por 10 min.

Grau de hidrólise (GH)

A metodologia descrita por Adler-Nissen (1979), com modificações, foi utilizada para avaliar o grau de hidrólise. Na reação 31,25 µL do hidrolisado foi acrescido de 250 µL de tampão fosfato de sódio 212 mM, pH 8,2 e 250 µL de TNBS 0,1% (v/v). A mistura reacional foi incubada a 50 °C por 60 min. Posteriormente, a reação foi interrompida por adição de 500 µL de HCl 100 mM e deixada em repouso na temperatura ambiente ± 25 °C ao abrigo da luz por 30 minutos. As leituras foram realizadas a 340 nm em espectrofotômetro (SpectraMax[®] Plus 384, Molecular Devices, Califórnia, EUA). A determinação dos grupos de aminoácidos totais foi segundo a metodologia proposta por Correa et al. (2011).

Tricina-SDS-PAGE

A eletroforese dos hidrolisados de caseína bovina foi realizada segundo Schagger (2006), na corrida foram empregados um tampão cátodo (tris-HCl 100 mM, tricina 1 mM, SDS 0,1% pH 8,25) e um ânodo (tris HCl 225 mM pH 8,9). O gel de concentração de amostra foi de 4% e separação 16% contendo ureia (6M). Utilizado como padrão de massa molecular o Precision Plus Protein[™] Dual Xtra Prestained Protein Standards (Bio-Rad, Califórnia, EUA). O Gel foi fixado em solução composta por metanol, água e ácido acético 5:4:1 (v/v) durante 30 minutos. Corado em solução de *Coomassie Brilliant Blue* G-250 0,025% (p/v), em ácido acético 10% (v/v), por 60 minutos e descorado em ácido acético 10% (v/v). Para aperfeiçoar a visualização das bandas, o gel foi contra corado na ausência do marcador de massa molecular com o kit Silver Stain Plus[™] (Bio-Rad, Califórnia, EUA).

Fracionamento dos hidrolisados de caseinato bovino

O fracionamento dos hidrolisados foi realizado por ultrafiltração com membrana de corte de 10 kDa, Amicon[®] Ultra-15 (Millipore Ireland Ltd, Tullagreen, Irlanda), centrifugados a 4000 x *g*, durante 40 minutos a 4 °C. O permeado foi usado nos ensaios antioxidantes com o intuito de atribuir os resultados a pequenas moléculas resultantes da

hidrólise, não sofrendo interferência das proteínas precursoras.

Determinação da atividade antioxidante

O potencial antioxidante das frações (<10 kDa) do hidrolisado bovino foi avaliado através de diferentes testes que aferiram sua habilidade de sequestrar radicais livres e quelar os íons metálicos ferro e cobre.

Sequestro do DPPH[•]

A capacidade de eliminar o radical DPPH[•] foi avaliada segundo Li et al. (2013b) com pequenas modificações. O radical (0,2 mM) foi solubilizado em etanol no momento do uso e ao abrigo de luz. A mistura reacional contendo 500 µL do hidrolisado e 500 µL do radical DPPH[•] foi incubada ao abrigo de luz por 30 minutos. As análises foram mensuradas a 517 nm e água destilada foi utilizada no lugar da amostra para o controle positivo. A atividade antioxidante foi observada tendo em vista seu potencial no sequestro do DPPH[•] de acordo com a Equação 1.

$$\text{Atividade sequestrante (\%)} = \left(\frac{A - B}{A} \right) \times 100$$

Equação 1

Sendo, A a densidade óptica (DO) do controle positivo, e B corresponde a absorbância da amostra.

Sequestro do ABTS^{•+}

A habilidade de sequestrar o radical ABTS^{•+} foi avaliada de acordo com Re et al. (1999) com modificações. O radical foi gerado ao abrigo da luz por 12-16 h na solução contendo persulfato de potássio (2,45 mM) e ABTS (7 mM), a absorbância do reagente foi ajustada para 0,70±0,02 a 734 nm. Para o ensaio 50 µL do hidrolisado foi acrescido de 950 µL do radical, incubado por 6 minutos a 30 °C e mensurado a 734 nm. No controle positivo a amostra foi substituída por água destilada e a Equação 1 foi utilizada para calcular a atividade sequestrante (%).

Atividade quelante de Metais

A competência dos hidrolisados em quelar os íons metálicos Cu^{2+} e Fe^{2+} foi avaliada de acordo com o método descrito por Sánchez-Vioque et al. (2013). Água mili-Q foi utilizada no controle negativo substituindo a amostra. As análises realizadas em triplicata e o percentual quelante foi calculado de acordo com a Equação 2.

$$\text{Atividade quelante (\%)} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100$$

Equação 2

Onde A_0 é a densidade óptica do controle negativo, e A_1 corresponde absorbância da amostra.

Análises estatísticas

Os resultados obtidos nos planejamentos experimentais foram analisados no software Statistica 8.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, EUA), com a finalidade de detectar os efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$), bem como o ajuste do modelo aos dados experimentais. Os experimentos foram realizados randomicamente. Os resultados obtidos foram utilizados para calcular o desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram identificadas pelo teste de Tukey usando o software R (R CORE TEAM, 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção das variáveis significativas na produção de proteases por G. pannorum S2B

O delineamento Plackett-Burman vem sendo amplamente empregado na identificação de variáveis que exercem efeito significativo sobre a produção de proteases. A produção da enzima apresentou uma variação de 0,20 a 350,20 U mL⁻¹, indicando a importância do uso de planejamentos estatísticos em bioprocessos (Tabela 3). Segundo Swetha et al. (2014), o conteúdo do meio influencia inteiramente na esporulação, no desenvolvimento celular e no

acúmulo de metabólitos pelo micro-organismo. Neste sentido, a seleção dos componentes do meio, tais como fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico, carbono, vitaminas, minerais e os parâmetros físicos, são etapas fundamentais para produção em maior escala. Uma das vantagens de produzir proteases através de fungos filamentosos é que as enzimas secretadas por eles podem ser recuperadas facilmente através da retirada dos micélios, evitando etapas mais laboriosas para obtenção do conteúdo enzimático (SOUZA et al., 2015).

A análise de variância mostrou que a regressão foi estatisticamente significativa (Tabela 4). Ademais, o ajuste do modelo foi mensurado pelo coeficiente de determinação, (R^2), que teve um valor de 0,9927 e R^2 adj = 0,9727, indicando que 99,27% da variação total da atividade foi explicada pelo modelo ajustado.

Os efeitos principais foram estimados por meio da diferença entre a soma das respostas obtidas no maior nível (+1) e menor nível (-1) de cada variável. Verificou-se que a ureia, glicose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e MgSO_4 apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) sobre a variável dependente (Figura 1) no campo experimental estudado. As concentrações de ureia e sulfato de amônio apresentaram seus efeitos negativos sobre a produção de protease, enquanto que a glicose e o sulfato de magnésio influenciaram de forma positiva. Assim, aqueles que atuaram de forma negativa e positiva devem ter seus níveis diminuídos e aumentados, respectivamente.

Resultados contrários foram encontrados por Reddy et al. (2008), os autores empregaram um delineamento Plackett-Burman aproveitando glicose, amido de milho, extrato de levedura, água de maceração de milho, sulfato de amônio, sulfato de magnésio, tamanho do inóculo e período de incubação para a produção de proteases alcalinas. Os dados demonstraram variação da atividade enzimática entre 329,32 e 531,52 U mL^{-1} . Somente o amido de milho, extrato de levedura, água de maceração de milho e tamanho do inóculo foram significantes na produção das proteases.

Neste estudo, a partir dos dados obtidos experimentalmente, as variáveis independentes não significativas no processo fermentativo foram fixadas no menor nível, e as significativas foram ajustadas em um novo desenho experimental objetivando a otimização da produção enzimática.

Otimização das condições de produção enzimática

O planejamento DCC foi construído com a finalidade de maximizar a produção das proteases por *G. pannorum* S2B. As concentrações de glicose, ureia, sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) e sulfato de magnésio (MgSO₄) foram avaliadas no modelo experimental de segunda ordem.

A partir dos dados obtidos experimentalmente (20,30 a 378,00 U mL⁻¹), a significância do modelo foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) e apresentada na Tabela 5, onde pode ser verificado que o ajuste foi estatisticamente significativo. A qualidade do ajuste do modelo também foi medida pelo coeficiente de determinação $R^2 = 0,903$ e o $R^2_{adj} = 0,8124$, indicando que o modelo ajustado explicou 90,3 % da variação total na atividade residual. O modelo citado pode ser utilizado para prever a produção de protease dentro do campo experimental estudado.

Os efeitos das variáveis foram estimados e apresentados na Tabela 6. A ureia e o sulfato de amônio em termos lineares exibiram efeito negativo, enquanto a glicose um efeito positivo. A interação entre a glicose e sulfato de magnésio foi significativa ($p < 0,05$), apresentando efeito positivo na produção da enzima no campo experimental estudado (Tabela 6). De acordo com Reddy et al. (2008), diversas fontes de carbono e nitrogênio já foram avaliadas no processo fermentativo para a produção de proteases. Todavia, dentre as fontes de carbono mais usadas estão melaço de cana e os açúcares refinados, entre as substâncias ricas em nitrogênio estão extratos de levedura e de malte e água de maceração de milho.

Os gráficos de superfície de resposta apresentados na Figura 2, foram desenhados com

a finalidade de direcionar para os níveis ótimos de produção da protease por *G. pannorum* S2B dentro das condições experimentais estudadas. Cada superfície de resposta apresenta o efeito de dois fatores, enquanto o terceiro foi fixado no seu ponto central.

Validação do modelo

A validação foi realizada em triplicata nas condições previstas pelo software Statistica 8.0 para o modelo experimental, sendo estas: ureia (0,020 g), glicose (0,036 g), sulfato de amônio (0,010 g) e sulfato de magnésio (0,002 g). Nestas condições o modelo calculou atividade proteásica de 438,39 U mL⁻¹. A proximidade com a resposta experimental de 476,27±13,93 U mL⁻¹ definiu a validação do modelo. Com a otimização foi possível aumentar em 2381,35 vezes a produção enzimática quando comparado às condições não otimizadas (0,20 U mL⁻¹).

Purificação da protease

A purificação da protease extracelular de *G. pannorum* S2B foi realizada por uma combinação de procedimentos, a enzima foi precipitada com acetona 70%, resultando em um fator de purificação de 1,2 e rendimento de 82%. Posteriormente, foi eluída em coluna de exclusão molecular acoplada ao sistema FPLC (AKTA), apresentando atividade proteásica de 74,21 U mL⁻¹ e proteína total de 0,46 mg mL⁻¹, rendimento de 29% e fator de purificação de 3,0. Hajji et al. (2007) purificaram uma protease secretada por *Aspergillus clavatus* ES1, inicialmente, por precipitação com acetona 40-60%, logo após, nas concentrações de 60-80%, em seguida, a enzima foi eluída nas colunas Sephadex G-100 e CM-Sepharose, recuperando 29% da protease com fator de purificação de 7,5. Annamalai et al. (2014) obtiveram fator de purificação de 2,6 e rendimento de 12,3%, ao perfazer as etapas de precipitação por (NH₄)₂SO₄, troca aniônica com a trocadora DEAE-Cellulose e exclusão molecular através da Sephadex G-50.

Grau de Hidrólise (GH)

A hidrólise do caseinato bovino em distintas temperaturas através da protease de *G. pannorum* S2B foi avaliada, e os resultados mostraram aptidão enzimática em atuar nas temperaturas de 5 e 10 °C, apresentando percentual de hidrólise de 4,16 e 4,24%, respectivamente. Todavia, a clivagem do caseinato bovino foi mais eficiente nas temperaturas de 30 e 40 °C, resultando em 8,99 e 9,45% de hidrólise, os quais foram mais elevados e estatisticamente distintos dos resultados obtidos nas demais temperaturas testadas. Além disso, o perfil da hidrólise foi observado por tricina-SDS-PAGE confirmando a hidrólise ascendente em relação ao aumento da temperatura (Figura 3). Norris et al. (2015) avaliando a hidrólise do caseinato sódico bovino e α -caseína por uma endoprotease comercial de *Aspergillus niger* (An-PEP) em função do tempo (1, 2, 3, 4, 8 e 24 h), observaram que depois de 3 horas do teste o grau de hidrólise do caseinato foi de 2,91% e após 24 h, 5,60%. Hidalgo et al. (2015) também avaliaram a influência do tempo (1, 2, 3, 4, 7 h) na hidrólise do caseinato sódico bovino com a protease de *Bacillus* sp. P7, empregando no teste a relação enzima substrato de 1:50 e a temperatura de 45 °C. Os pesquisadores observaram que após 3, 4 e 7 h o GH foi em torno de 4,6, 6,2 e 8,2%, respectivamente. Segundo os autores, apesar deste último tempo ter apresentado maior GH, as maiores taxas de hidrólise ocorreram nas primeiras quatro horas. Visto que o grau de hidrólise avalia a quantidade de ligações peptídicas clivadas, logo, as taxas mais brandas no aumento do GH sugerem menor disponibilidade de sítios de clivagem no substrato. O grau de hidrólise pode influenciar no produto, pois, se o processo ocorrer num tempo prolongado outras moléculas podem ser formadas e modificar características sensoriais do alimento (DINIZ; MARTIN, 1996).

Potencial antioxidante dos hidrolisados: sequestro radicalar

Comumente diferentes metodologias são usadas com o intuito de identificar novos compostos antioxidantes. Um desses métodos envolve a capacidade das substâncias de reduzir

o DPPH[•] e o ABTS^{•+}, estes radicais livres tem capacidade de aceitar átomos de hidrogênio ou elétrons, tornando-se mais estáveis (LI et al., 2013b).

A hidrólise do caseinato bovino através da protease de *G. pannorum* S2B permitiu desprender da cadeia polipeptídica peptídeos antioxidantes e a temperatura foi um parâmetro que influenciou na liberação de sequências eliminadoras de radicais. Entre as temperaturas de 5 e 30 °C foi observado um comportamento ascendente para o sequestro do ABTS^{•+}. Quando a hidrólise ocorreu a 30 °C a eliminação do radical foi de 26,73%. Este percentual não apresentou diferença estatisticamente significativa com os percentuais obtidos nas temperaturas 20 e 40 °C (19,63 e 19,09%, respectivamente), porém, foram significativamente distintos aos resultados observados nas temperaturas de 5 e 10°C. Ademais, todos os hidrolisados obtidos apresentaram habilidade em eliminar o radical DPPH[•], entretanto, não houve diferença estatística entre os percentuais (Figura 4).

Corrêa et al. (2011) avaliando hidrolisados de caseinato ovino produzidos no intervalo de tempo de 0 a 4 h, todos na temperatura de 45 °C, observaram que as amostras resultantes do tempo 1 h foram as que apresentaram maior potencial no sequestro do DPPH[•] (30,9%) nas condições testadas. Entretanto, o resultado para o ABTS^{•+} também foi distinto, expondo maior habilidade na eliminação do radical o hidrolisado produzido com 4 h de hidrólise. Doenças ligadas ao estresse oxidativo podem ser retardadas e muitas vezes até mesmo evitadas se houver equilíbrio entre a geração de moléculas oxidantes e a atuação eficiente dos sistemas antioxidantes do organismo. No entanto, substâncias exógenas que apresentam essa bioatividade, principalmente as de origem natural como hidrolisados e peptídeos de proteínas alimentares podem ser inseridos à dieta que é extremamente importante na modulação do estresse oxidativo (HIDALGO et al., 2015).

Potencial antioxidante dos hidrolisados: quelante de metais de transição

A capacidade de quelar os metais de transição ferro e cobre foi observada em todos os

hidrolisados de caseinato bovino obtidos em diferentes temperaturas (Figura 5). Todos os hidrolisados exibiram habilidade em quelar ferro, contudo, os melhores resultados foram observados nas amostras derivadas das hidrólises entre 5 e 30 °C. Por outro lado, o teste quelante de cobre teve implicações diferentes, a temperatura de mais alta testada (40 °C) foi a mais eficiente na liberação de peptídeos quelante deste metal de transição (19,98%), resultado estatisticamente igual ao observado nas amostras obtidas nas temperaturas de 20 e 30 °C (Figura 5).

Gobba et al. (2014) avaliaram frações microfiltradas de leite de cabra hidrolisadas com subtilisina, tripsina e a combinação de ambas enzimas na temperatura de 50 °C. Os permeados exibiram capacidade quelante de ferro em torno de 75%, resultados inferiores foram observados na amostra retida. Os autores sugerem que substâncias de baixa massa molecular associados aos peptídeos podem ser responsáveis por essa bioatividade. Resultado semelhante foi detectado por Corrêa et al., (2011) no hidrolisado de caseinato ovino, obtido através da protease de *Bacillus* sp. P7, na temperatura de 45 °C, no qual o percentual quelante do ferro foi de 72,2%. Cobre, ferro, cromo e outros metais podem produzir radicais reativos como o ânion superóxido e o óxido nítrico. De modo que, a quelação de metais redox ativos pode evitar dano oxidativo ao organismo. Adémas, na peroxidação lipídica os metais de transição são capazes de incentivar a ampliação desta reação modificando as características sensoriais de alimentos (ZHANG et al., 2010; SÁNCHEZ-VIOQUE et al., 2013).

CONCLUSÃO

A utilização de ferramentas estatísticas permitiu estudar a interação entre os parâmetros em diferentes níveis e desse modo aumentar a produção de proteases a partir de *Geomyces pannorum* S2B isolado da Antártica. A enzima hidrolisou o caseinato bovino em diferentes temperaturas, a clivagem das caseínas associada a ultrafiltração permitiu gerar e separar o conteúdo peptídico com potencial antioxidante, capaz de sequestrar os radicais

DPPH[•] e ABTS^{•+}, além de apresentar destaque na quelação dos metais de transição ferro e cobre.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE IBPG-0626-5.05/12), à Fundação Estadual de Pesquisa de São Paulo (FAPESP 2010/17033-0 e 2013/19486-0), CAPES (PROCAD NF717/2010), Universidade Federal Rural de Pernambuco e a Universidade de São Paulo, Brasil.

REFERÊNCIAS

Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. J. Agric. Food Chem. 1970;27:1256-62.

<http://dx.doi.org/10.1021/jf60226a042>

Akcan N. Production of extracellular protease in submerged fermentation by *Bacillus licheniformis* ATCC 12759. Afr. J. Biotechnol. 2012;11:1729-35.

<http://dx.doi.org/10.5897/AJB11.2183>

Annamalai N, Rajeswari MV, Sahu SK, Balasubramanian T. Purification and characterization of solvent stable, alkaline protease from *Bacillus firmus* CAS 7 by microbial conversion of marine wastes and molecular mechanism underlying solvent stability. Process Biochem. 2014;49:1012-9.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.007>

Castro RJS, SATO HH. A response surface approach on optimization of hydrolysis parameters for the production of egg white protein hydrolysates with antioxidant activities. Biocatal Agric Biotechnol. 2015;4:55-62.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.07.001>

Charney J, Tomarelli RM. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. J. Biol. Chem. 1947;170:501-5.

<http://www.jbc.org/content/171/2/501.full.pdf?sid=7a27b28e-6116-4066-b3b4-371f78c83030>

Correa APF, Daroit DJ, Coelho JG, Meira SMM, Lopes FC, Segalin J, Risso PH, Brandelli, A. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *J Sci Food Agric*. 2011;91:2247-54.

<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.4446>

Diniz FM, Martin AM. Use of Response Surface Methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *Int J Food Sci Tech*. 1996;31:419-426.

<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2621.1996.00351.x/abstract>

Gobba C, Espejo-Carpio FJ, Skibsted LH, Otte J. Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolysed by two commercial proteases. *Int Dairy J*. 2014;39:28-40.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.03.015>

Gupta R, Beg QK, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002;59:15-32. 2002.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-002-0975-y>

Hajji M, Kanoun S, Nasri M, Gharsallah N. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochem*. 2007;42:791-7.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2007.01.011>

Hidalgo ME, Côrrea APF, Canales MM, Daroit DJ, Brandelli A, Risso P. Biological and physicochemical properties of bovine sodium caseinate hydrolysates obtained by a bacterial protease preparation. *Food Hydrocoll*. 2015;43:510-20.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.009>

Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int Dairy J*. 2006;16:945-60.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>

Li Q, Yi L, Marek P, Iverson BL. Commercial proteases: Present and future. FEBS Lett. 2013a;587:1155-63.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.12.019>

Li Z, Jiang A, Yue T, Wang J, Wang Y, Su J. purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. J Dairy Sci. 2013b;96:4242-51.

<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-6511>

Mohan SK, Viruthagiri T, Arunkumar C. Statistical optimization of process parameters for the production of tannase by *Aspergillus flavus* under submerged fermentation. 3 Biotech. 2014;4:159-66.

<http://dx.doi.org/10.1007/s13205-013-0139-z>

Norris R, O'Keefe MB, Poyarkov A, FitzGerald RJ. Peptide identification and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity in prolyl endoproteinase digests of bovine α -casein. Food Chem. 2015;188:210-17.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.130>

Phelan M, Aherne A, FitzGerald RJ, O'Brien NM. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. Int Dairy J. 2009;19:643-54.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.12.004>

Plackett RL, Burman JP. The design of optimum multi-factorial experiments. Biometrika. 1946;33:305-25.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999;26:1231-7.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Reddy LVA, Wee YJ, Yun JS, Ryu HW. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Bioresource Technol.* 2008;99:2242-9.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.006>

Sánchez-Vioque R, Polissiou M, Astraka K, Mozos-Pascual M, Tarantilis P, Herraiz-Peñalver D, Santana-Méridas O. Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. *Ind. Crops Prod.* 2013;49:150-9.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.053>

Schägger H. Tricine–SDS–PAGE. *Nat. Protoc.* 2006;1:16-22.

<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.4>

Shankar S, Rao M, Laxman RS. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. *Process Biochem.* 2011;46:579-585.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.10.013>

Souza PM, Bittencourt MLA, Caprara CC, Freitas M, Almeida RPC, Silveira D, Fonseca YM, Filho EXF, Pessoa-Junior A, Magalhães PO. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Braz. J. Microbiol.* 2015;46:337-46.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246220140359>

Swetha S, Varma A, Padmavathi T. Statistical evaluation of the medium components for the production of high biomass, α -amylase and protease enzymes by *Piriformospora indica* using Plackett–Burman experimental design. *3 Biotech.* 2014;4:439-45.

<http://dx.doi.org/10.1007/s13205-013-0168-7>

Tavano OL. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2013;90:1-11.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>

Zhang L, Li J, Zhou K. Chelating and radical scavenging activities of soy protein

hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation.

Bioresource Technol. 2010;101:2084-89.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.078>

TABELAS

Tabela 1. Valores reais e codificados para a seleção de variáveis na produção de proteases por *Geomyces pannorum* S2B, usando o delineamento Plackett-Burman.

Código	Variáveis	Unidade	Níveis	
			-1	1
A	Farelo de trigo	g	0,025	0,25
B	Torta de algodão	g	0,025	0,25
C	Extrato de levedura	g	0,025	0,25
D	Peptona	g	0,025	0,25
E	Triptona	g	0,025	0,25
F	Ureia	g	0,025	0,25
G	Glicose	g	0,0125	0,025
H	(NH ₄) ₂ SO ₄	g	0,0125	0,025
I	CaCl ₂	g	0,00125	0,0025
J	NaCl	g	0,00125	0,0025
K	MgSO ₄	g	0,00125	0,0025

Tabela 2. Valores reais e codificados empregados no Delineamento Composto Central para otimização da produção de proteases por *G. pannorum* S2B.

Variáveis independentes	Unidade	Níveis				
		- α^*	-1	0	+1	+ α
Ureia	g	0,034	0,068	0,137	0,171	0,206
Glicose	g	0,016	0,020	0,025	0,029	0,033
(NH ₄) ₂ SO ₄	g	0,000	0,003	0,018	0,021	0,025
MgSO ₄	g	0,0018	0,0021	0,0025	0,0028	0,0031

*: $\alpha = 2,00$

Tabela 3. Matriz do delineamento de Plackett-Burman contendo os valores codificados, os dados experimentais e preditos para o modelo na produção de proteases por *G. pannorum* S2B.

Ensaio	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	Atividade proteásica U mL ⁻¹	
												Experimental	Calculada
1	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	261,00	273,25
2	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	0,20	-0,44
3	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	275,50	282,63
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	263,10	255,96
5	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	186,65	197,76
6	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	1,90	7,66
7	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	107,95	103,32
8	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	3,25	-2,51
9	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	26,75	27,39
10	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	177,30	166,18
11	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	76,25	66,50
12	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	350,20	337,94
13	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	12,60	17,22
14	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	104,85	114,59
15	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	212,15	228,38
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	238,20	221,96

Tabela 4. Análise de variância para os dados obtidos no planejamento de Plackett-Burman na produção de proteases por *Geomyces pannorum* S2B isolado no continente Antártico.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	<i>F-cal</i>	<i>p-valor</i>
Regressão	20178,60	11	18342,60	49,68	0,00092*
Resíduo	1476,80	4	369,20		
Total	203245,40				

*: Estatisticamente significativa. *Fcal* – F calculado. (Nível de confiança: 95%).

Tabela 5. Análise de variância para os dados obtidos no Delineamento Composto Central para produção de proteases por *Geomyces pannorum* S2B isolado no continente Antártico.

Fonte de Variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Fcal	Ftab	p valor
Regressão	254214,70	14	18158,19	9,97	2,42	3,37e-05*
Resíduo	27307,40	15	1820,49			
Falta de ajuste	21747,30	10	2174,73	1,96	4,74	0,23
Puro erro	5560,00	5	1112,00			
Total	281522,00	29				

*: Estatisticamente significativa. Fcal – F calculado; Ftab – F tabelado (Nível de confiança: 95%).

Tabela 6. Estimativa dos efeitos das variáveis na produção protease por *G. pannorum* S2B conforme o planejamento Delineamento Composto Central.

Variáveis	Efeitos	<i>t</i>	<i>p</i> -valor	
Ureia (L)	-197,54	-13,569	0,00004	s
Ureia (Q)	-30,01	-1,652	0,15938	
Glicose (L)	37,69	2,664	0,04466	s
Glicose (Q)	14,66	1,158	0,29930	
(NH ₄) ₂ SO ₄ (L)	-41,77	-2,802	0,03790	s
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Q)	-75,85	-2,153	0,08397	
MgSO ₄ (L)	-10,23	-0,724	0,50157	
MgSO ₄ (Q)	-7,58	-0,602	0,57346	
Ureia (L) x Glicose (L)	13,95	0,850	0,43399	
Ureia (L) x (NH ₄) ₂ SO ₄ (L)	-4,47	-0,285	0,78680	
Ureia (L) x MgSO ₄ (L)	33,14	2,019	0,09945	
Glicose (L) x (NH ₄) ₂ SO ₄ (L)	10,45	0,670	0,53265	
Glicose (L) x MgSO ₄ (L)	47,30	2,837	0,03639	s
(NH ₄) ₂ SO ₄ (L) x MgSO ₄ (L)	-7,17	-0,460	0,66507	

s: Estatisticamente significativo. Nível de confiança 95 %.

FIGURAS

Figura 1. Gráfico de Pareto contendo os efeitos das variáveis testadas no planejamento Plackett-Burman, tendo como variável resposta à atividade proteásica (U mL^{-1}) do *G. pannorum* S2B.

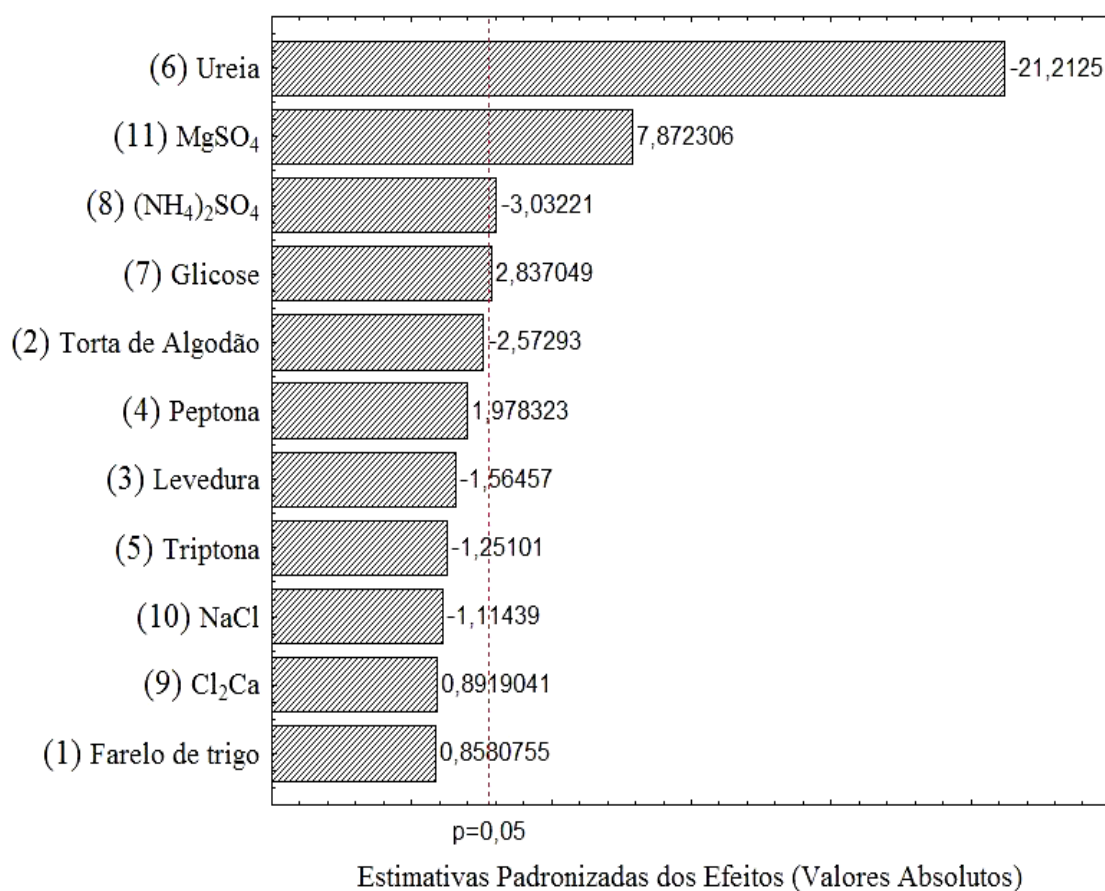


Figura 2. Superfície de resposta e curvas de contorno para a produção de protease por *G. pannorum* S2B, interação de MgSO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (a), da glicose e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (b), do MgSO_4 e glicose (c), ureia e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (d), ureia e MgSO_4 (e), ureia e glicose (f).

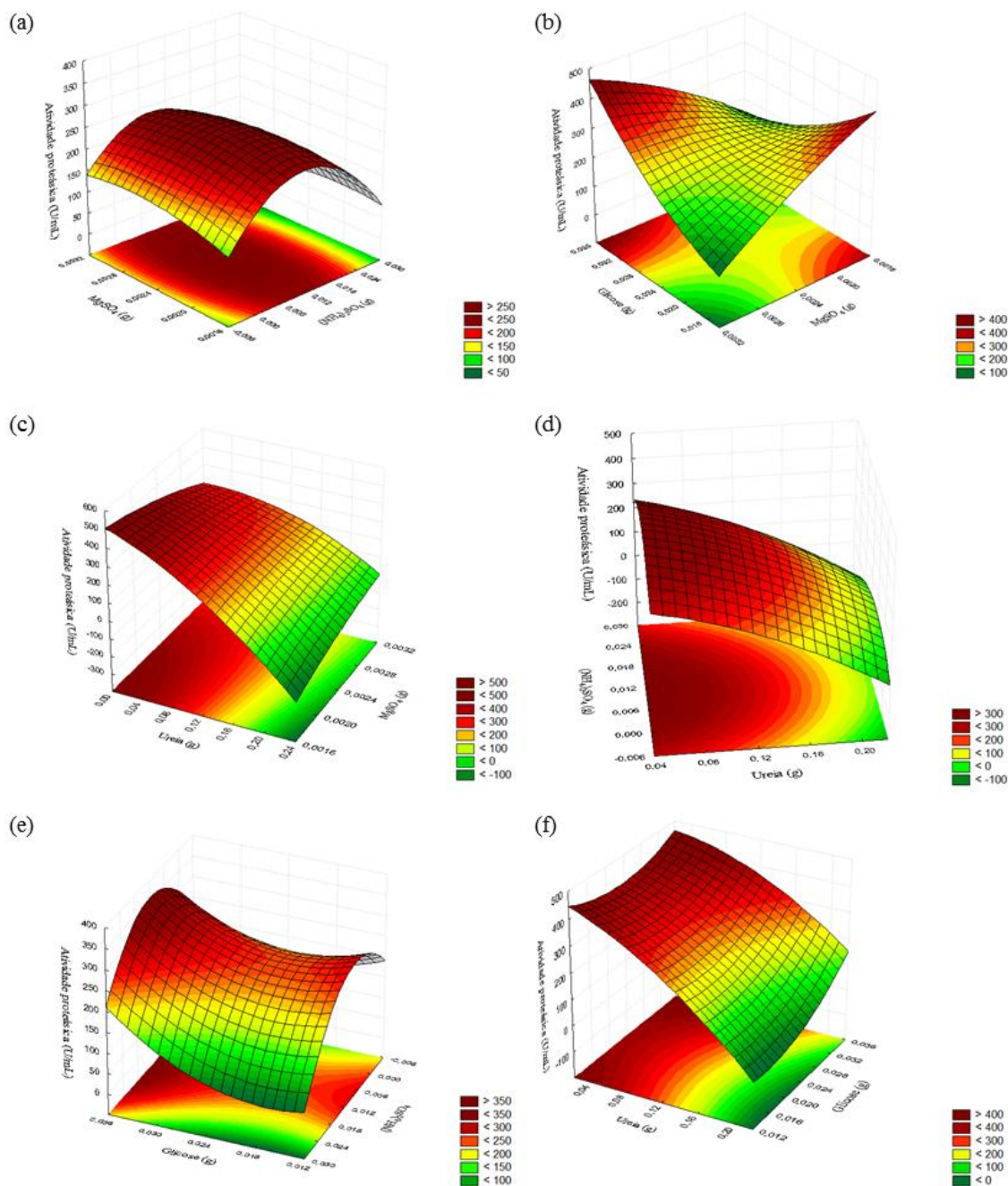


Figura 3. Perfil eletroforético tricina-SDS-PAGE dos hidrolisados de caseína bovina obtidos por ação da protease de *G. pannorum* S2B, onde Padrão corresponde ao padrão de massa molecular, CB ao caseinato bovino não hidrolisado e nas demais colunas os hidrolisados em função da temperatura (°C).

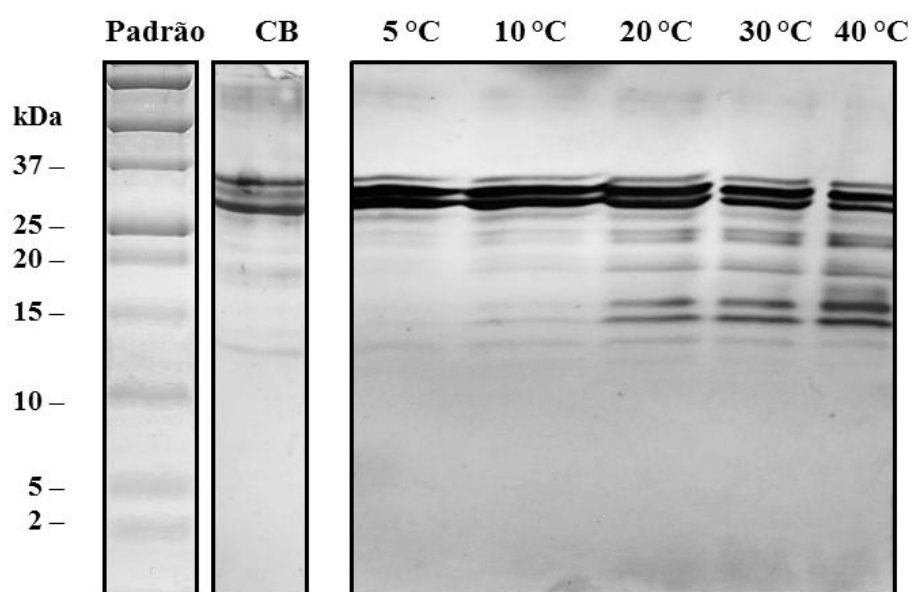


Figura 4. Capacidade dos hidrolisados bovino obtidos a partir da protease de *Geomyces pannorum* S2B sequestrar os radicais ABTS^{•+} e DPPH[•].

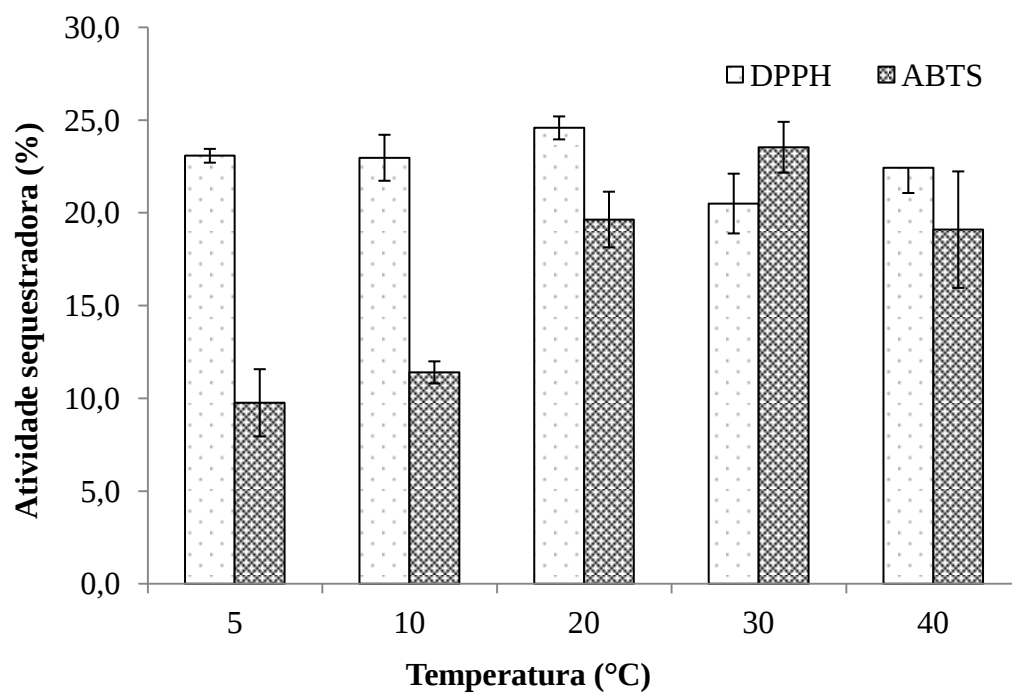
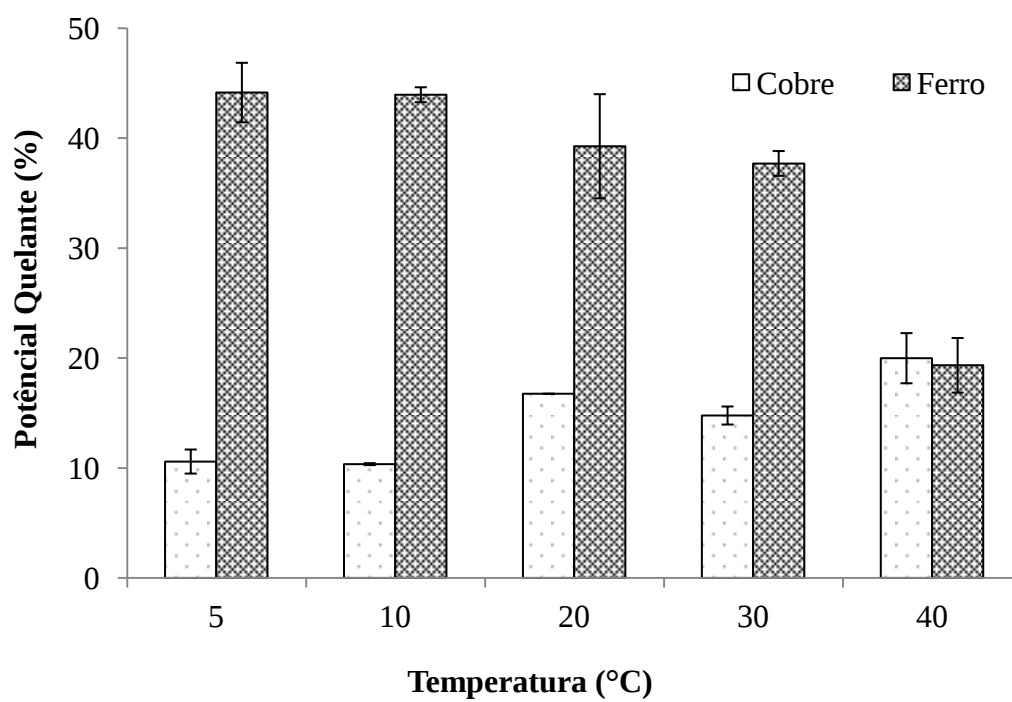


Figura 5. Capacidade dos hidrolisados bovino obtidos a partir da protease de *Geomyces pannorum* S2B de quelar metais de transição cobre e ferro.



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A proposta de bioconversão de produtos agrícolas através de processos fermentativos para produção de biocatalisadores apresentada no estudo é atrativa e viável no âmbito biotecnológico.
- As proteases secretadas por fungos filamentosos isolados da Antártica representam uma oportunidade em bioprocessos, uma vez que estas proteínas apresentam maior flexibilidade que permite atuar em diferentes condições de temperatura, salinidade e pH.
- Os hidrolisados apresentaram potencial antioxidante e antimicrobiano, podendo ser aproveitados na elaboração de conservantes naturais de alimentos.
- Se os hidrolisados forem caracterizados quanto a sua segurança para consumo humano, será possível sua aplicação na formulação de alimentos funcionais, úteis na prevenção ou até mesmo no tratamento de doenças crônicas como a hipertensão.
- As bioatividades detectadas *in vitro* neste estudo podem ser resultantes da ação individual de alguns peptídeos presentes no hidrolisado ou estar atreladas ao efeito sinérgico de várias sequências biologicamente ativas contidas na mistura. Contudo, são necessárias novas investigações voltadas à purificação, identificação e avaliação destes peptídeos.

APÊNDICES

Apêndice I. Nomenclatura, identificação taxonômica e origem dos isolados de fungos filamentosos do continente Antártico utilizados neste trabalho de tese.

Isolado (N°)	Amostra	Origem	ID taxonômica
E5B	Estrela do mar	Marinha	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
L1-4B	Líquen	Terrestre	<i>Acremonium</i> sp.
S2C	<i>Salpa</i> sp. (tunicado)	Marinha	<i>Penicillium</i> sp.
A1-1A	Ascídia	Marinha	<i>Penicillium</i> sp.
S2B	<i>Salpa</i> sp. (tunicado)	Marinha	<i>Geomyces pannorum</i>

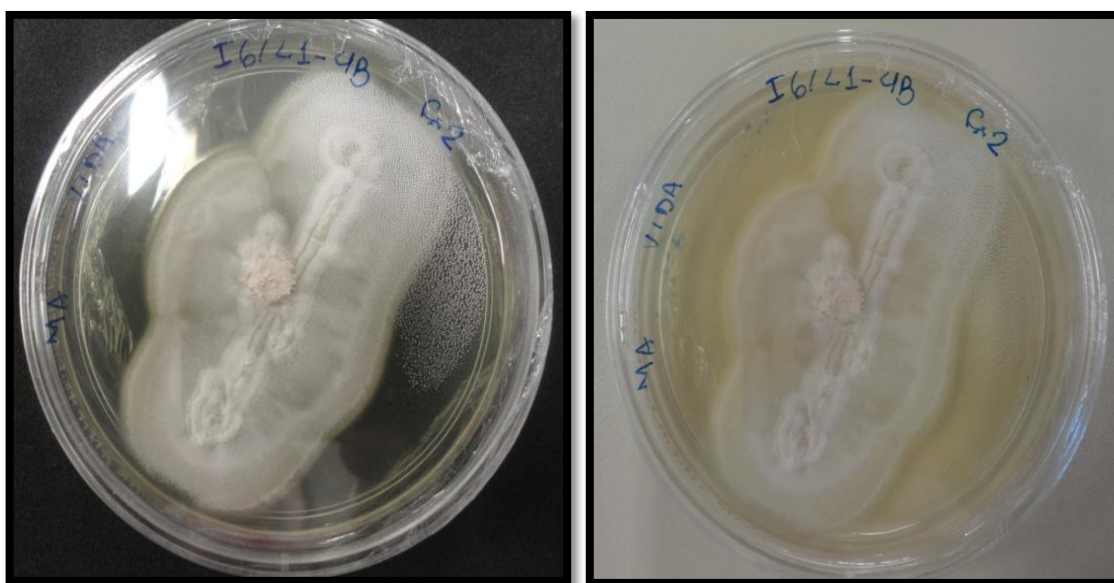
Apêndice II. Fungos proteolíticos isolados de amostras da Antártica e empregados no estudo.



Apêndice III. Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos substratos empregados nas fermentações da tese (capítulo I e III).

Amostra	Carbono (%)	Hidrogênio (%)	Nitrogênio (%)
Torta de algodão	44,82	6,73	3,01
Farelo de soja	41,82	6,34	8,04
Farelo de trigo	37,83	6,24	2,58
Tryptona	43,74	8,5	12,74
Peptona	41,48	8,29	13,5
Extrato de levedura	40,07	6,54	12,38
Extrato de palma	32,9	5,8	0,8

Apêndice IV. Fungo filamentoso *Acremonium* sp. L1-4B isolado de amostra de líquen Antártica utilizado no capítulo I.



Apêndice V. Meio de cultivo a base de extrato de palma antes e depois da fermentação por *Acremonium* sp. L1-4B (capítulo I).



Apêndice VI. Capítulo I publicado na revista Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 4 (2015) 737–744

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bab

ELSEVIER

Extracellular serine proteases by *Acremonium* sp. L1-4B isolated from Antarctica: Overproduction using cactus pear extract with response surface methodology

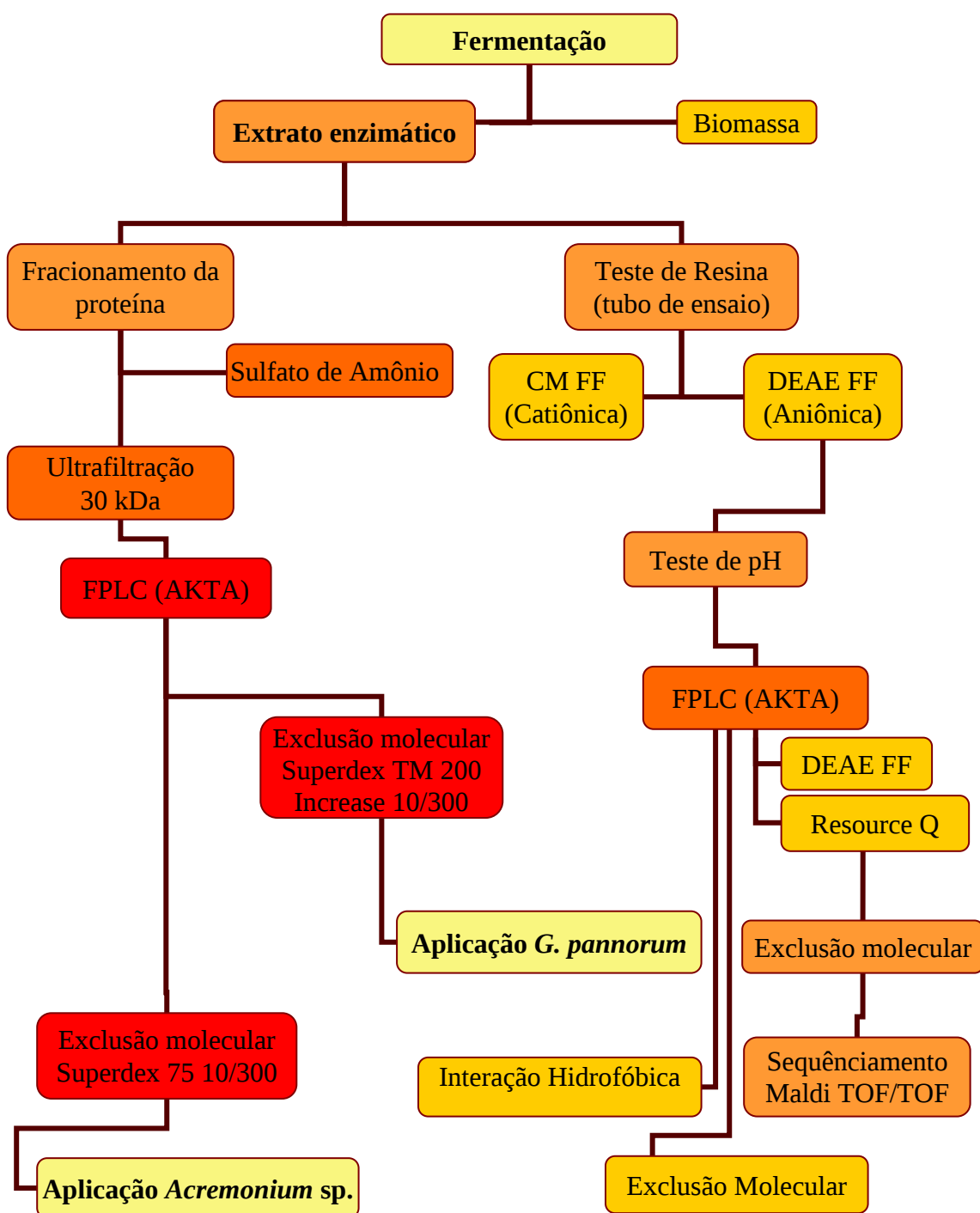
Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento^a, Amanda Reges de Sena^b, José Erick Galindo Gomes^c, Wellington Leal dos Santos^d, Gualberto Segundo Agamez Montalvo^e, Elias Basile Tambourgi^f, Erika Valente de Medeiros^d, Lara Durães Sette^g, Adalberto Pessoa Junior^h, Keila Aparecida Moreira^{d,*}

 CrossMark

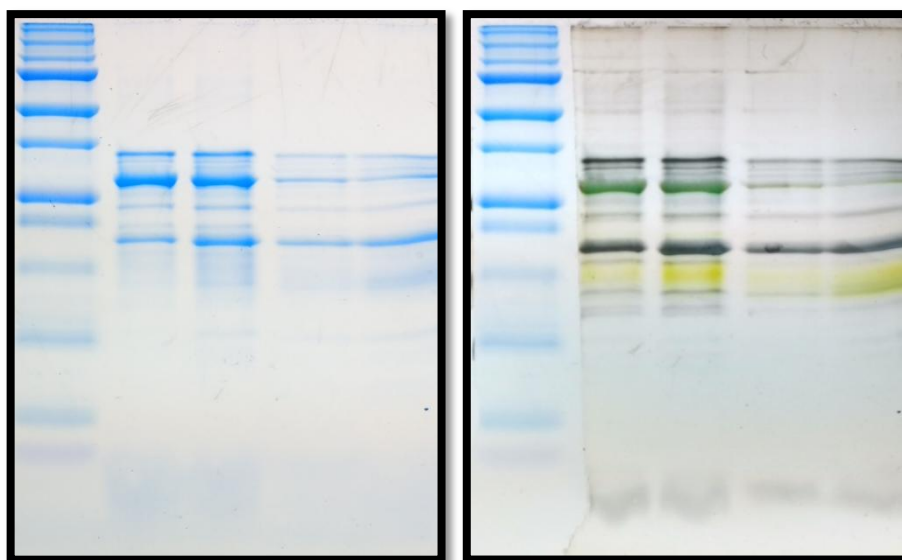
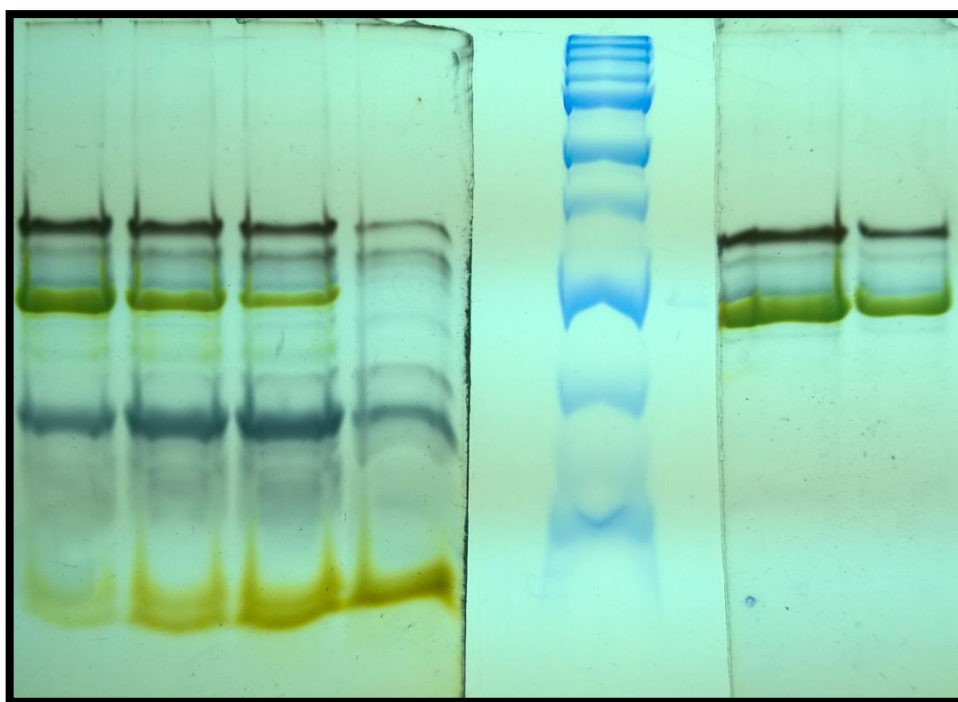
Apêndice VII. Tabela de purificação da protease de *Acremonium* sp. L1-4B, utilizando ultrafiltração e a coluna de exclusão molecular (Superdex 75 10/300) acoplada ao sistema FPLC (capítulo II).

Amostra / fração	Atividade Proteasica (U)	Proteína (mg)	Atividade Específica	Volume (mL)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato Bruto	594,954	8,770	67,8	1,0	1	100
Retido 30kDa	444,713	2,788	159,5	1,0	2,4	75
4	0,98	0,092	10,5	2,0	0	0
5	33,38	0,117	284,4	2,0	8	11
6	104,10	0,124	836,2	2,0	25	35
7	58,80	0,165	355,9	2,0	10	20
8	87,75	0,288	305,1	2,0	9	29
9	14,10	0,539	26,1	2,0	1	5
10	2,85	0,082	34,7	2,0	1	1

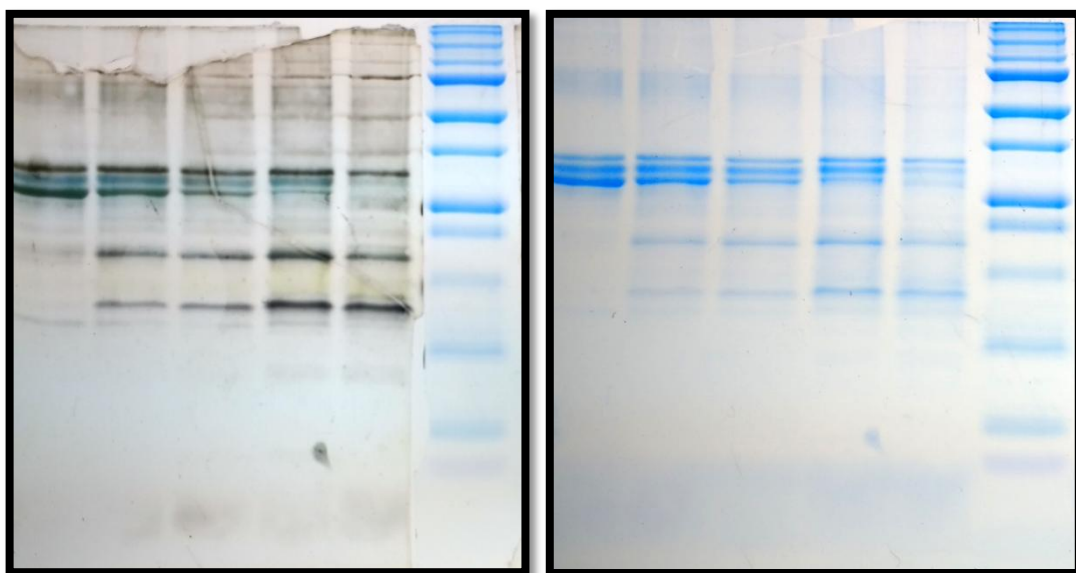
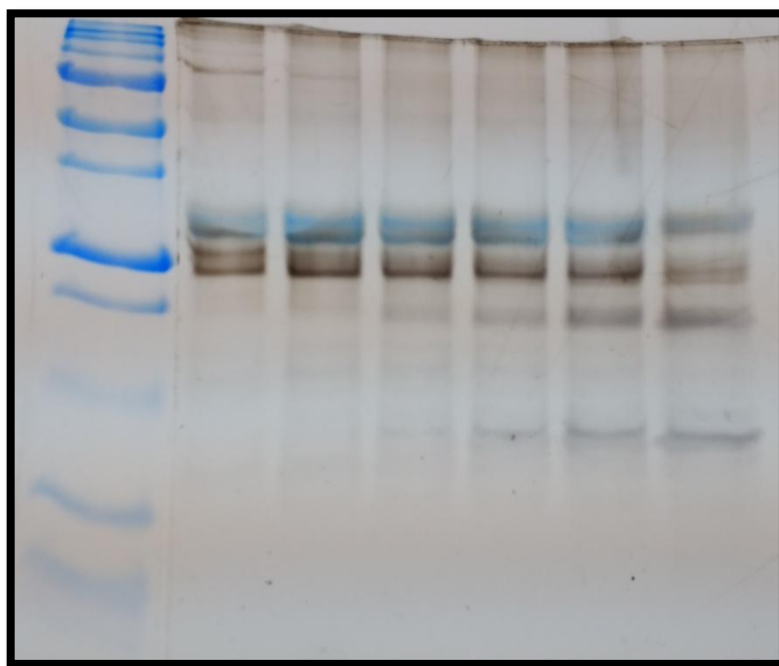
Apêndice VIII. Estratégias de purificação utilizadas no estudo (capítulo II e III).



Apêndice IX. Perfil eletroforético (Tricina-SDS-PAGE) dos hidrolisados de caseína caprina obtidos através da protease de *Acremonium* sp. L1-4B (1º gel - separação 15%, 2 e 3º gel - separação 16% com ureia 6M).



Apêndice X. Perfil eletroforético (Tricina-SDS-PAGE) dos hidrolisados de caseína bovina obtidos através da protease de *Acremonium* sp. L1-4B (1º gel - separação 15%, 2 e 3º gel - separação 16% com ureia 6M).



Apêndice XI. Dados da espectrometria de massas (MS/MS) realizada para os hidrolisados bovino e caprino (tempo 8 h), resultados apresentados no capítulo II.

Equipamento: MAXIS 3G – Bruker Daltonics

Fonte: CaptiveSpray

Dry gas: 3 l/min - Temp: 150 °C

HV: 3000 V - Método: captive_150_2200_instant_expertise

NanoAcquity Waters

✚ Solvente A: H₂O 0.1% ácido fórmico

✚ Solvente B: Acetonitrila 0.1% ácido fórmico

Condições de Trapping

✚ Coluna: nanoAcquity UPLC® 2G-V/MTrap 5µm Symmetry® C18 180 µm x 20 mm

✚ Tempo: 3 min

✚ Fluxo: 7 µL/min

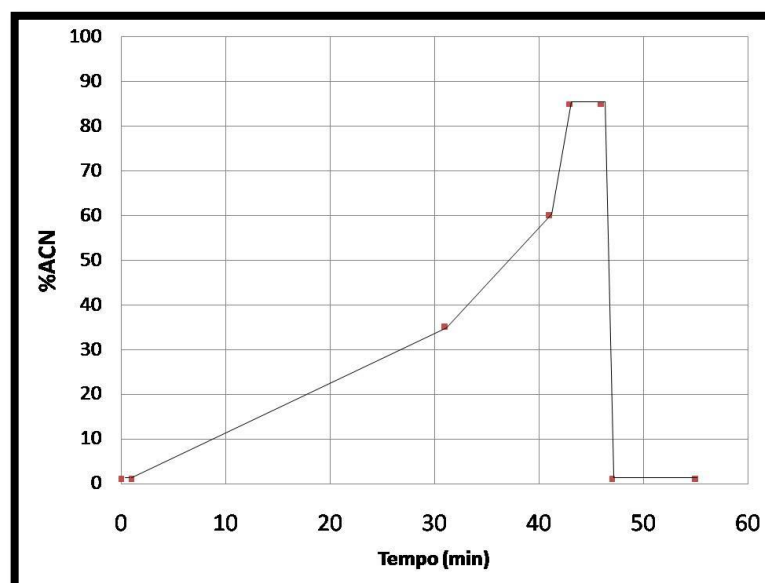
Condições da corrida

✚ Coluna: nanoAcquity UPLC® 1.7µm BEH130 100 µm x 100 mm

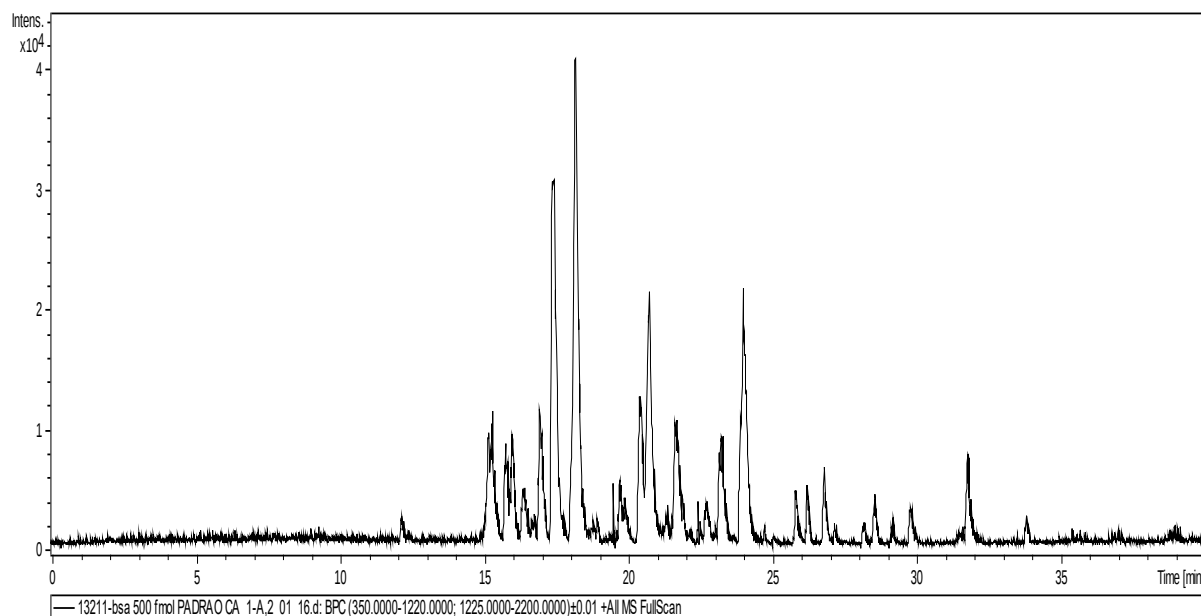
✚ Fluxo: 0.4 µl/min

✚ Volume amostra injetado: 1µL.

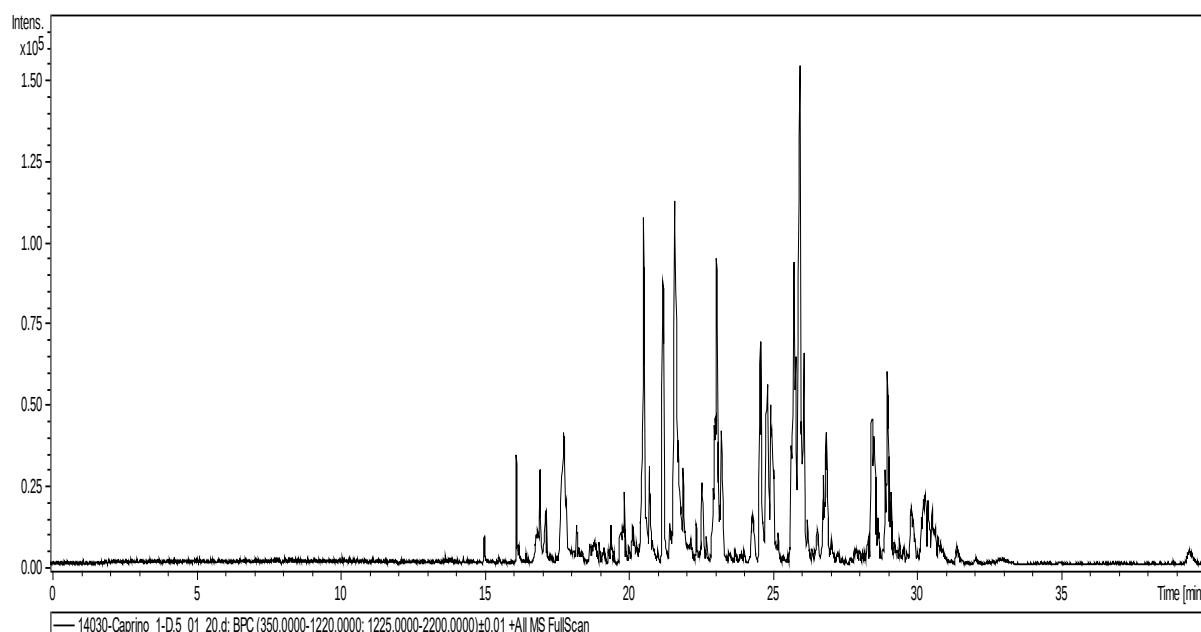
Gradiente:



Apêndice XII. Espectro de massa do hidrolisado bovino (tempo 8 h), seus resultados foram apresentados no capítulo II.



Apêndice XIII. Espectro de massa do hidrolisado caprino (tempo 8 h), seus resultados foram apresentados no capítulo II.



Apêndice XIV. Identificação por MS/MS das proteínas expressas.

Name							Score	Sequence					Calculated
Espécie	Protein ID	Database	UniProt	SwissProt	Protein name	Taxonomy	Mascot	coverage (%)	Matches	Sequence	emPAI	Mass (Da)	pI (theor.)
BOVINO	1	SwissProt	http://www.uniprot.org/uniprot/P02662	CASA1_BOVIN	Alpha S1casein	<i>Bos taurus</i>	851	29	81 (55)	11 (9)	2.14	24570	4.98
BOVINO	2	SwissProt	http://www.uniprot.org/uniprot/P02666	CASB_BOVIN	Beta-casein	<i>Bos taurus</i>	90	34	83 (16)	11 (4)	0.64	25148	5.26

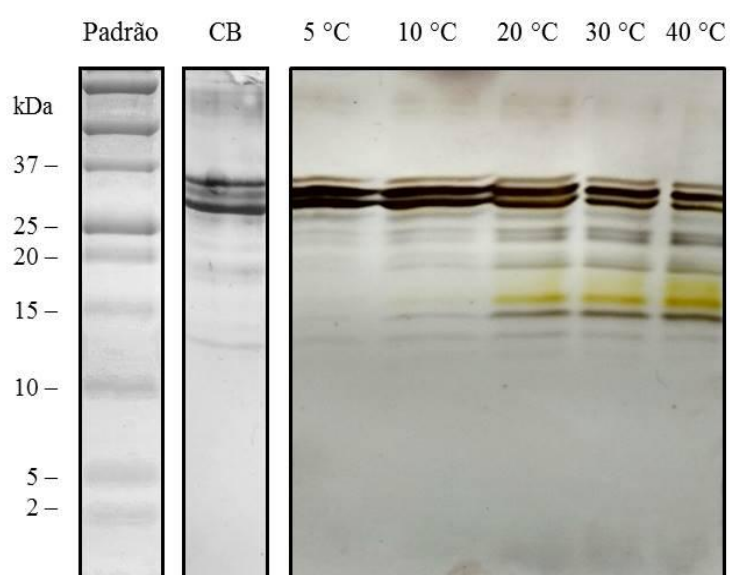
Name							Score	Sequence					Calculated
Espécie	Protein ID	Database	UniProt	SwissProt	Protein name	Taxonomy	Mascot	coverage (%)	Matches	Sequence	emPAI	Mass (Da)	pI (theor.)
CAPRINO	1	SwissProt	http://www.uniprot.org/uniprot/P33048	CASB_CAPHI	Beta-casein	<i>Capra hircus</i>	432	68	257 (67)	29 (16)	9.86	24906	5.26

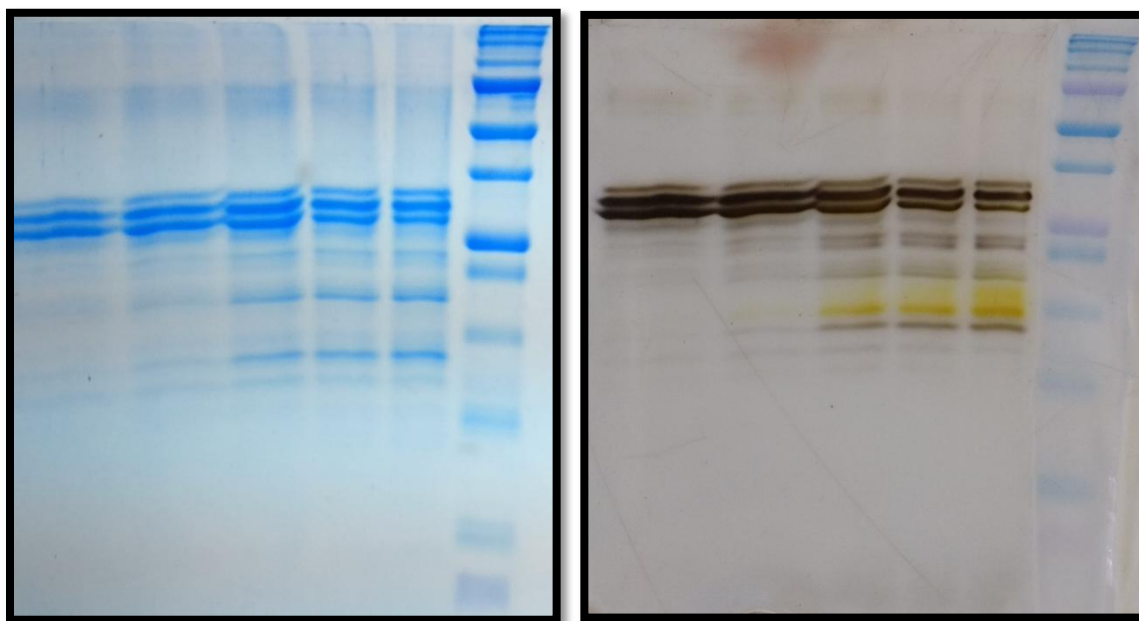
Distribuição da pontuação (*scores*) peptídica. Ions é $-10 \log (P)$, onde P é a probabilidade de que a correspondência observada é um evento aleatório. Índices individuais > 44 indicam identidade ou homologia extensa ($p < 0,05$).

Apêndice XV. Fungo *Geomyces pannorum* S2B empregado na produção de proteases apresentada no capítulo III.



Apêndice XVI. Perfil eletroforetico (Tricina-SDS-PAGE) dos hidrolisados de caseína bovina obtidos através da protease de *G. pannorum* S2B no capítulo III (gel - separação 16% com ureia 6M).





Apêndice XVII. Trabalhos relacionados a pesquisa apresentados em congressos e simpósios.

Título: Avaliação do desenvolvimento fúngico e da produção de proteases em biorreator por *Cladosporium cladosporioides* isolado de estrela do mar da Antártica.

Tipo: Resumo / Pôster

Autores: Nascimento, T.C.E.S., Gomes, J.E.G., Jozala, A.F., Piraino, D.F.W., Aires, C.D., Rodrigues, A, Sette, L.D., Pessoa-Junior, A., Moreira, K.A.

Evento: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia (CBM 2013).

Período: 29/09 a 03/10 de 2013.

Cidade / Estado: Natal, Rio Grande do Norte.

País: Brasil.

Título: Influência de diferentes fatores na produção de proteases por fermentação submersa do fungo *Acremonium* sp. L1-4B isolado de líquen do continente Antártico

Tipo: Resumo / Pôster

Autores: Nascimento, T.C.E.S., Gomes, J.E.G., Silva, A.C., Nascimento, P.L.A., Jozala, A.F., Rodrigues, A., Medeiros, E.V., Sette, L.D., Pessoa-Junior, A., Moreira, K.A.

Evento: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia (CBM 2013).

Período: 29/09 a 03/10 de 2013.

Cidade / Estado: Natal, Rio Grande do Norte.

País: Brasil.

Título: Processo fermentativo sinérgico para obtenção de proteases, celulasas, amilases e xilanases por *Cladosporium cladosporioides* isolado na Antártica.

Tipo: Resumo / Pôster

Autores: Wellington Leal dos Santos, Edson Flavio Teixeira da Silva, Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento, Cesar Andres Diaz Arias, Daniel Francisco Weinacker Piraino, José Erick Galindo Gomes, Bruna de Souza Divino, Rafaela Coelho Correia, Lara Durães Sette, Adalberto Pessoa Junior, Keila Aparecida Moreira.

Evento: XXII Congresso Latinoamericano de Microbiologia (ALAM 2014).

Período: 5 a 8 de Novembro de 2014.

Cidade / Estado: Cartagena, Departamento de Bolívar.

País: Colombia.

Título: Dinâmica da fermentação de *Geomyces pannorum* S2B para obtenção de proteases: curva de biomassa, pH e produção enzimática.

Tipo: Resumo expandido / Pôster

Autores: Wellington Leal dos Santos, Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento, José Erick Galindo Gomes, Gilvannya Gonçalves de Sobral, Lara Durães Sette, Adalberto Pessoa Junior; Keila Aparecida Moreira.

Evento: IV Simpósio de Engenharia e Ciência de Alimentos (SECCA 2014).

Período: 11 a 14 de novembro de 2014.

Cidade / Estado: São José do Rio Preto, São Paulo.

País: Brasil

Título: Curva de produção e biomassa do psicrófilo *Geomyces pannorum* S2B

Tipo: Resumo / Pôster

Autores: Gilvannya Gonçalves de Sobral, Keila Aparecida Moreira, Adalberto Pessoa Junior, Lara Durães Sette, Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento, Edson Flávio Teixeira da Silva, Wellington Leal dos Santos.

Evento: XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE (JEPEX 2014)

Período: 25 a 27 de novembro de 2014.

Cidade / Estado: Garanhuns, Pernambuco.

País: Brasil.

Título: Produção de celulasas através do *Geomyces pannorum* isolado na Antártica utilizando delineamento experimental Plackett-burman.

Tipo: Resumo / Pôster.

Autores: Wellington Leal dos Santos, Edson Flávio Teixeira da Silva, Gilvannya Gonçalves de Sobral, Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento, Lara Durães Sette, Adalberto Pessoa Junior, Keila Aparecida Moreira.

Evento: XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE (JEPEX 2014)

Período: 25 a 27 de novembro de 2014.

Cidade / Estado: Garanhuns, Pernambuco.

País: Brasil.

Título: Produção de proteases a partir de fungos psicrófilos isolados do continente Antártico por fermentação submersa.

Tipo: Resumo / Pôster

Autores: Gilvannya Gonçalves de Sobral, Keila Aparecida Moreira, Adalberto Pessoa Junior, Lara Durães Sette, Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento, Edson Flávio Teixeira da Silva, Wellington Leal dos Santos.

Evento: XIV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE (JEPEX 2014)

Período: 25 a 27 de novembro de 2014.

Cidade / Estado: Garanhuns, Pernambuco.

País: Brasil.

Título: A rapid screening of significative variables in the production of proteases and amylases by submerged fermentation of *Geomyces pannorum* S2B

Tipo: Resumo / Pôster.

Autores: Wellington Leal dos Santos, Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento, Ana Paula S. Maciel, Mauro C. Vilar, Gualberto Segundo Agamez Montalvo, Lara Durães Sette, Adalberto Pessoa Junior, Keila Aparecida Moreira.

Evento: 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia (CBM 2015).

Período: 18 a 22 de outubro de 2015.

Cidade / Estado: Florianópolis, SC. País: Brasil.