

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CERRO LARGO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E TECNOLOGIAS
SUSTENTÁVEIS

ANDRÉIA MONIQUE LERMEN

PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEASE
BACTERIANA E SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS
BIOATIVOS A PARTIR DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA

CERRO LARGO

2020

ANDRÉIA MONIQUE LERMEN

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEASE
BACTERIANA E SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS
BIOATIVOS A PARTIR DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento de Processos e Tecnologias

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

CERRO LARGO

2020

Lermen, Andréia Monique

Purificação parcial e caracterização de uma protease bacteriana e sua aplicação na produção de hidrolisados bioativos a partir de proteína isolada de soja / Andréia Monique Lermen. -- 2020.

101 f.:il.

Orientador: Doutor Daniel Joner Daroit

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis, Cerro Largo, RS, 2020.

1. Enzima. 2. Caracterização bioquímica. 3. Inativação térmica. 4. Hidrólise. 5. Bioatividade. I. Daroit, Daniel Joner, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

ANDRÉIA MONIQUE LERMEN

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEASE
BACTERIANA E SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS
BIOATIVOS A PARTIR DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Área de Concentração: Monitoramento, Controle e Gestão Ambiental

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento de Processos e Tecnologias

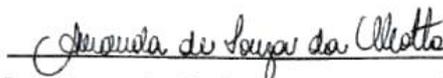
Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

Esta Dissertação foi defendida e aprovada pela banca em: 05/03/2020

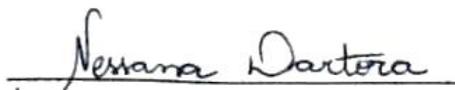
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Daniel Joner Daroit - UFFS



Profa. Dra. Amanda de Souza da Motta - UFRGS



Profa. Dra. Nessana Dartora - UFFS

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Daniel Joner Daroit, pelos ensinamentos, auxílio, paciência e dedicação em todas etapas deste trabalho. Agradeço pela oportunidade em trabalhar ao seu lado e por todo conhecimento adquirido ao longo dessa caminhada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela verba de custeio concedida a projeto do orientador e que possibilitou esta pesquisa.

À coordenação, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS), em especial, ao Professor Doutor Diego Ricieri Manenti (*in memoriam*), primeiro coordenador do Programa e meu primeiro orientador na pesquisa científica, pelos exemplos de dedicação e valiosos ensinamentos.

Aos colegas do PPGATS, pela amizade e pelos momentos que compartilhamos.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia, especialmente a Mestre Kelly Callegaro, pelos ensinamentos iniciais e a aluna da graduação, Naiara Jacinta Clerici, por toda ajuda nos experimentos e amizade.

À Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), por proporcionar o acesso à qualificação profissional.

À minha família, por todo incentivo e apoio incondicional.

RESUMO

A diversidade microbiana é um recurso valioso para a obtenção de proteases, que conforme suas propriedades, podem ser adequadas a diversos processos biocatalíticos. A hidrólise de proteínas é uma temática relevante considerando as bioatividades exibidas por hidrolisados proteicos, atribuídas a peptídeos liberados neste processo. Nesta investigação, uma protease de *Bacillus* sp. CL 18 foi parcialmente purificada, caracterizada e utilizada na produção de hidrolisados de proteína isolada de soja (PIS) que foram subsequentemente avaliados quanto a potenciais bioatividades *in vitro*. A purificação parcial foi realizada através de precipitação com sulfato de amônio (saturação de 25-50%) e cromatografia de gel filtração. Frações da cromatografia, com atividade proteolítica, foram reunidas e usadas como protease parcialmente purificada (PPP; 1.565 U/mL). Este processo resultou em fator de purificação de 60,7 vezes (40.593 U/mg proteína) e rendimento de 21,3% (32.150 U). A PPP exibiu atividade ótima a 55 °C (51-59 °C) e pH 8,0 (7,4-8,8). Na presença de íons (1 e 5 mM), a atividade foi estimulada por Ca^{2+} (~7%), não afetada por Mg^{2+} , mas inibida por Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} . Tween 20 e dimetil sulfóxido não influenciaram a atividade, que foi inibida por Triton X-100, dodecil sulfato de sódio (SDS) e β -mercaptoetanol. A inibição por fluoreto de fenil-metil-sulfonila (PMSF) caracterizou a PPP como serino protease. A inativação térmica obedeceu uma cinética de primeira ordem. Na ausência e presença de Ca^{2+} (5 mM), a meia-vida da PPP foi de 2,0 e 76,1 min a 60 °C, respectivamente, demonstrando a importância de Ca^{2+} na termoestabilidade. A PPP foi capaz de hidrolisar caseína > PIS >>> substratos queratinosos. A hidrólise da PIS (10 g/L) pela PPP (2% v/v = HPIS2; 4% v/v = HPIS4), realizada a 55 °C, na presença de 5 mM Ca^{2+} , por até 5 h, resultou em incremento da concentração de proteínas solúveis, que atingiu 4,8 (HPIS2) e 5,2 mg/mL (HPIS4) após 4 h, em comparação à PIS (~1,95 mg/mL). A capacidade de eliminação do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico) (ABTS) pela PIS (~17,7%) foi incrementada para 69% após 4 h. A eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi elevada para 39,8-42,2% após 4 h de hidrólise, em relação à PIS (~27,4%). Em comparação à PIS, aumentos na redução de Fe^{3+} foram demonstrados durante a hidrólise; contudo, não ocorreram efeitos consistentes sobre a quelação de Fe^{2+} . Indica-se que a ação da PPP liberou peptídeos com capacidade antioxidante exercida pela captura de radicais e transferência de elétrons. Hidrolisados (4 h) demonstraram 89,1% (HPIS4) e 65,6% (HPIS2) de inibição da enzima conversora de angiotensina (ACE) em relação à PIS (8-12%). A inibição da enzima dipeptidil peptidase IV (DPP IV) pela PIS (4,1-5,2%) também foi elevada pela hidrólise, alcançando 29,4-33,0% após 4 h. As inibições de ACE e DPP IV pelos hidrolisados sugere a presença de peptídeos com potenciais anti-hipertensivo e antidiabético, respectivamente. Esta PPP, ativa e estável em condições moderadas, pode ser empregada na produção de hidrolisados bioativos a partir da PIS. Tanto a PPP quanto os hidrolisados podem encontrar aplicações em ciência e tecnologia de alimentos.

Palavras-chave: Enzima. Caracterização bioquímica. Inativação térmica. Hidrólise. Bioatividade.

ABSTRACT

Microbial diversity is a valuable resource for obtaining proteases which, depending on their properties, may be suitable for different biocatalytic processes. Protein hydrolysis is a relevant topic considering the bioactivities exhibited by protein hydrolysates, attributed to peptides released in this process. In this investigation, a protease from *Bacillus* sp. CL 18 was partially purified, characterized and used in the production of soy protein isolate (SPI) hydrolysates, which were subsequently evaluated for potential *in vitro* bioactivities. Partial purification was performed through ammonium sulfate precipitation (25-50% saturation) and gel-filtration chromatography. Chromatography fractions displaying proteolytic activity were pooled and used as partially purified protease (PPP; 1,565 U/mL). This process resulted in a purification factor of 60.7 fold (40,593 U/mg protein) with a 21.3% yield (32,150 U). PPP exhibited optimal activity at 55 °C (51-59 °C) and pH 8.0 (7.4-8.8). In the presence of ions (1 and 5 mM), activity was stimulated by Ca²⁺ (~7%), unaffected by Mg²⁺, but inhibited by Mn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Fe²⁺ and Zn²⁺. Tween 20 and dimethyl sulfoxide did not influence the activity, which was inhibited by Triton X-100, sodium dodecyl sulfate (SDS) and β-mercaptoethanol. Inhibition by phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) characterized PPP as a serine protease. Thermal inactivation followed first order kinetics. In the absence and presence of Ca²⁺ (5 mM), PPP half-life was 2.0 and 76.1 min at 60 °C, respectively, demonstrating the importance of Ca²⁺ for thermostability. PPP was able to hydrolyze casein > SPI >>> keratinous substrates. The hydrolysis of SPI (10 g/L) by the PPP (2% v/v = HPIS2; 4% v/v = HPIS4), performed at 55 °C, in the presence of 5 mM Ca²⁺, for up to 5 h, resulted in increased concentrations of soluble proteins, reaching 4.8 (HPIS2) and 5.2 mg/mL (HPIS4) after 4 h, as compared to PIS (~1.95 mg/mL). Scavenging of 2,2'-azinobis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical by SPI (~17.7%) was increased to 69% after 4 h. Scavenging of radical 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazil (DPPH) radical was increased to 39.8-42.2% after 4 h of hydrolysis, as compared to SPI (~27.4%). In comparison to SPI, increases in the reduction of Fe³⁺ have been demonstrated during hydrolysis; however, there were no consistent effects on Fe²⁺ chelation. It is indicated that the action of PPP released peptides with antioxidant capacity exerted by radical scavenging and electron transfer. Hydrolysates (4 h) inhibited angiotensin-converting enzyme (ACE) by 89.1% (HPIS4) and 65.6% (HPIS2), as compared to SPI (8-12%). Inhibition of the enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) by SPI (4.1-5.2%) was also increased by hydrolysis, reaching 29.4-33.0% after 4 h. ACE and DPP IV inhibitions by the hydrolysates suggest the presence of peptides with antihypertensive and antidiabetic potentials, respectively. This PPP, active and stable at moderate conditions, can be used to produce bioactive hydrolysates from SPI. Both PPP and hydrolysates can find applications in food science and technology.

Keywords: Enzyme. Biochemical characterization. Thermal inactivation. Hydrolysis. Bioactivity.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Proteases usadas na hidrólise de proteína isolada de soja e bioatividades demonstradas pelos hidrolisados.....	31
---	----

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1 - Sumário da purificação parcial da protease de <i>Bacillus</i> sp. CL18.....	45
Tabela 2 - Efeitos da temperatura e pH, avaliados através de delineamento composto central rotacional (CCDR 2 ²), sobre a atividade da protease parcialmente purificada de <i>Bacillus</i> sp. CL18.	48
Tabela 3 - Efeito das variáveis independentes (temperatura e pH) e sua interação sobre a atividade da protease parcialmente purificada.	49
Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão.....	50
Tabela 5 - Influência de vários sais, em diferentes concentrações, sobre a atividade da protease parcialmente purificada de <i>Bacillus</i> sp. CL18.....	52
Tabela 6 - Influência de vários reagentes, em diferentes concentrações, na atividade da protease parcialmente purificada de <i>Bacillus</i> sp. CL18.....	53
Tabela 7 - Influência de inibidores, em diferentes concentrações, sobre a atividade da protease parcialmente purificada de <i>Bacillus</i> sp. CL18.....	54
Tabela 8 - Parâmetros cinéticos da inativação térmica da PPP.....	58
Tabela 9 - Parâmetros termodinâmicos para a inativação de primeira ordem da protease parcialmente purificada.	60
Tabela 10 - Hidrólise de substratos pela protease parcialmente purificada, por 2h, a 55 °C e ph 8,0.	62

LISTA DE FIGURAS

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 1 - Perfil de eluição de sobrenadantes de <i>Bacillus</i> sp. CL18 concentrados com sulfato de amônio (saturação de 25-50%) aplicados à coluna de gel-filtração Sephadex G-100. Atividade proteolítica (■; U/mL), proteínas solúveis (●; mg/mL)...46	46
Figura 2 - Análises eletroforéticas das proteases bruta e parcialmente purificada. (a) SDS-PAGE: Linha 1, marcador de massa molecular; Linha 2: protease bruta; Linha 3: protease parcialmente purificada. (b) Zimograma: Linha 1: protease bruta; Linha 2: protease parcialmente purificada.47	47
Figura 3 - Superfície de resposta para os efeitos da temperatura e do pH sobre a atividade da protease parcialmente purificada.50	50
Figura 4 - Atividade da PPP em função de diferentes temperaturas, na ausência de íons metálicos (○) e na presença de Ca ²⁺ (5 mM; ●) ou Mg ²⁺ (10 mM; ■).....55	55
Figura 5 - Inativação térmica da PPP em função da temperatura e tempo de pré-incubação, ajustada ao modelo de primeira ordem. (a) Em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8), sem a adição de íons, a 50 (■), 52,5 (□), 55 (◆), 57,5 (◇) e 60 °C (●). (b) Em tampão com 10 mM M Mg ²⁺ , a 50 (■), 52,5 (□), 55 (◆), 57,5 (◇) e 60 °C (●). (c) Em tampão com 5 mM Ca ²⁺ , a 60 (■), 62,5 (□), 65 (◆), 67,5 (◇) e 70 °C (●).57	57
Figura 6 - Hidrólise de PIS, avaliada através da concentração de proteínas solúveis, pela protease parcialmente purificada nas concentrações de 2 e 4% (v/v).....64	64
Figura 7 - Captura do radical ABTS por hidrolisados de PIS obtidos em função do tempo de hidrólise e diferentes concentrações de PPP (2 e 4%, v/v).65	65
Figura 8 - Captura do radical DPPH por hidrolisados de PIS obtidos em função do tempo de hidrólise e diferentes concentrações de PPP (2 e 4%, v/v).66	66
Figura 9 - Poder redutor de hidrolisados de PIS obtidos em função do tempo de hidrólise e diferentes concentrações de PPP (2 e 4%, v/v).68	68
Figura 10 - Capacidade quelante de Fe ²⁺ de hidrolisados de PIS obtidos em função do tempo de hidrólise e diferentes concentrações de PPP (2 e 4%, v/v).70	70
Figura 11 - Inibição da ACE, in vitro, por hidrolisados de PIS obtidos em função do tempo de hidrólise e diferentes concentrações de PPP (2 e 4%, v/v).72	72
Figura 12 - Inibição da DPP IV, in vitro, por hidrolisados de PIS obtidos em função do tempo de hidrólise e diferentes concentrações de PPP (2 e 4%, v/v).73	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: Sulfato de amônio

$\Delta G^\#$: Variação da Energia livre de inativação

$\Delta H^\#$: Variação da Entalpia de inativação

$\Delta S^\#$: Variação da Entropia de inativação

A: Constante de Arrhenius

A/A_0 : Atividade proteolítica residual

ABTS: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

ACE: Enzima conversora de angiotensina-I

Ca^{2+} : Íon cálcio

CaCl_2 : Cloreto de Cálcio

CCDR: Design rotativo composto central

Co^{2+} : Íon cobalto

CoCl_2 : Cloreto de Cobalto

CP: Caldo Pena

Cu^{2+} : Íon cobre

CuSO_4 : Sulfato de Cobre

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DPP IV: Dipeptidil peptidase IV

E_a : Energia de ativação

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

Fe^{2+} : Íon ferroso

Fe^{3+} : Íon férrico

FeCl_3 : Cloreto férrico

FeSO_4 : Sulfato ferroso (II)

GIP: Polipeptídeo inibitório gástrico

GL: Graus de liberdade

GLP1: Peptídeo 1 semelhante ao glucagon

h : Constante de Planck

HCl: Ácido clorídrico

HEPES: Ácido 2- [4-(2-hidroxietil) piperazin-1-il] etanossulfônico

HPIS: Hidrolisados de proteína isolada de soja

k: Constante de inativação do modelo de 1ª ordem
K₂HPO₄: Fosfato dipotássico
K₂SO₄: Sulfato de potássio
K_b: Constante de Boltzmann
KDa: Quilodalton
KH₂PO₄: Fosfato monopotássico
KPa: Quilopascal
Mg²⁺: Íon magnésio
MgCl₂: Cloreto de magnésio
Mn²⁺: Íon manganês
MnSO₄: Sulfato de manganês
MQ: Média dos quadrados
NaCl: Cloreto de sódio
NaOH: Hidróxido de sódio
NH₄Cl: Cloreto de amônio
OH: Radical hidroxila
P: Atividade proteolítica
PCA: Ágar Padrão para Contagem
pH: Potencial hidrogeniônico
PIS: Proteína isolada de soja
PMSF: Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PPP: Protease parcialmente purificada
R²: Coeficiente de determinação
R: Constante universal dos gases
rpm: Rotação por minuto
SDS: Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
SmF: Fermentação submersa
SQ: Soma dos quadrados
SSF: Fermentação em estado sólido
*t*_{1/2}: Tempo de meia vida
TCA: Ácido tricloroacético
Zn²⁺: Íon zinco
ZnCl₂: Cloreto de zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVOS	14
1.1.1 Objetivo geral	14
1.1.2 Objetivos específicos.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 PROTEASES MICROBIANAS	15
2.1.1 Microrganismos produtores de proteases extracelulares.....	16
2.1.2 Produção de proteases microbianas.....	17
2.1.3 Purificação e propriedades de proteases microbianas	19
2.1.4 Aplicações de proteases microbianas	20
2.2 HIDROLISADOS PROTEICOS BIOATIVOS	23
2.2.1 Capacidade antioxidante	24
2.2.2 Potencial anti-hipertensivo.....	26
2.2.3 Potencial antidiabético	27
2.2.4 Hidrolisados de proteína isolada de soja (PIS).....	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.1 RESULTADOS I	33
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	87
REFERÊNCIAS	88

1. INTRODUÇÃO

O abate e o processamento de aves geram subprodutos, como vísceras e penas. As penas são compostas basicamente por queratinas (90%) e representam em torno de 5 a 10% do peso corporal das aves (BRANDELLI, 2008). No ano de 2018, foram abatidos em torno de 5,7 bilhões de frangos, totalizando 13,5 bilhões de toneladas de carcaça de frango (IBGE, 2019). Estima-se, com estes indicadores, que foram produzidas em torno de 640 mil toneladas de penas como resíduo da indústria avícola nacional em 2018.

Devido à natureza recalcitrante e a alta quantidade de penas que vem sendo gerada, é necessário destinar corretamente estes resíduos, tendo em vista que o manejo incorreto pode resultar em problemas ambientais e também no desperdício de uma fonte de proteínas (LASEKAN et al., 2013).

A bioconversão é uma alternativa promissora para o manejo destes resíduos, visto que, além do baixo custo, representa tecnologia ecologicamente adequada que pode resultar em produtos de elevado valor agregado (CHATURVEDI et al., 2014). Para a bioconversão das penas empregam-se microrganismos queratinolíticos. A degradação destes materiais usualmente depende da produção de proteases extracelulares, que podem ser recuperadas a partir destes bioprocessos (DAROIT; BRANDELLI, 2014).

Proteases, enzimas que atuam hidrolisando ligações peptídicas em proteínas, possuem diversas aplicações biotecnológicas. Indústrias de couros, detergentes e alimentos estão entre aquelas que utilizam estes biocatalisadores. Devido à versatilidade de aplicações, as proteases microbianas apresentam-se como insumos amplamente valorizados nos níveis comercial e industrial (RAZZAQ et al., 2019). De fato, estas proteases representam a maior parcela das enzimas comercializadas globalmente (KASANA et al., 2011).

Assim, a prospecção de microrganismos proteolíticos e de suas proteases são foco de constantes investigações. Especificamente, dentre os microrganismos produtores de proteases, destacam-se bactérias representantes do gênero *Bacillus* (CONTESINI et al., 2018). Contudo, a proposição de processos enzimáticos depende, como pressuposto básico, da caracterização das condições ótimas para a biocatálise, da estabilidade das enzimas e da verificação da capacidade de hidrolisar diferentes substratos proteicos (SILVA, 2017).

Hidrolisados proteicos são complexas misturas de peptídeos e aminoácidos derivados da clivagem de ligações peptídicas realizada pelas proteases. A hidrólise de proteínas alimentares por enzimas proteolíticas vem sendo amplamente estudada, principalmente pela observação de que os hidrolisados obtidos podem apresentar atividades biológicas. Estas bioatividades se devem aos peptídeos liberados durante a hidrólise enzimática, ou seja, estes fragmentos proteicos não apresentam quaisquer atividades enquanto parte da proteína precursora (SÁNCHEZ; VAZQUEZ, 2017).

Dentre as atividades biológicas destacam-se os potenciais antidiabético, anti-hipertensivo e antioxidante, demonstrando a significância dos hidrolisados proteicos e peptídeos para a nutrição e saúde humana, encontrando aplicações em indústrias farmacêuticas e de alimentos. O interesse em relação aos hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos também se deve ao reconhecimento do vínculo entre a saúde humana e a dieta, à crescente demanda dos consumidores por alimentos naturais, nutritivos e funcionais, além da preocupação com o uso de aditivos químicos em alimentos (SARMADI; ISMAIL, 2010; MÖLLER et al., 2008).

Produtos à base de proteína de soja vêm sendo utilizados há décadas como ingredientes em alimentos. A proteína isolada da soja (PIS) possui excelente qualidade nutricional; além disso, é empregada na modulação de propriedades tecnológicas e sensoriais em alimentos, devido especialmente à sua capacidade emulsificante e de retenção de água. Adicionalmente, estudos vêm demonstrando que hidrolisados e peptídeos derivados da PIS podem exercer diversas atividades biológicas (ZHANG et al., 2010; SINGH et al., 2014).

As propriedades bioativas são definidas pela sequência e pela posição dos aminoácidos constituintes dos peptídeos. Desta forma, tanto as proteínas a serem hidrolisadas, quanto a especificidade das enzimas proteolíticas usadas na hidrólise são importantes na determinação dos perfis peptídicos obtidos e, assim, das potenciais bioatividades (SARMADI; ISMAIL, 2010). Neste contexto, a exploração de novas proteases microbianas pode contribuir para a obtenção de hidrolisados de PIS com atividades biológicas (AGUILAR; SATO, 2018).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Aplicar uma protease bacteriana parcialmente purificada na produção de hidrolisados de PIS e avaliar suas potenciais atividades biológicas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Produzir protease através da bioconversão de penas de frango, utilizando o isolado bacteriano *Bacillus* sp. CL 18.
- Purificar parcialmente e caracterizar a protease produzida.
- Utilizar a protease parcialmente purificada na produção de hidrolisados de proteína isolada de soja.
- Caracterizar, *in vitro*, atividades antioxidantes, anti-hipertensiva e antidiabética dos hidrolisados de proteína isolada de soja.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROTEASES MICROBIANAS

As proteases, também conhecidas como peptidases, formam um grupo diverso de enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas em proteínas e peptídeos, convertendo-os em peptídeos menores ou até mesmo aminoácidos livres (BANERJEE; RAY, 2017).

A classificação das proteases é realizada por diversos critérios, como o tipo de reação catalisada, mecanismo catalítico e sua estrutura molecular. Para além do caráter fisiológico essencial das proteases, visto que são produzidas por todos os organismos vivos, estas enzimas formam um relevante grupo de biocatalisadores empregados a nível comercial e industrial. Neste sentido, as propriedades bioquímicas e a especificidade de hidrólise de diferentes substratos são fundamentais para avaliar potenciais aplicações (SILVA, 2017).

Embora enzimas proteolíticas possam ser obtidas a partir de animais e plantas, microrganismos são considerados como fontes preferenciais de proteases devido à ampla diversidade microbiana, elevada produção através de cultivos realizados em espaços e períodos reduzidos, que resultam em maior disponibilidade e, também menores custos para obtenção. Ainda como vantagens em relação às enzimas de origem vegetal e animal, a produção de enzimas microbianas não é influenciada por condições climáticas e/ou sazonais e nem por aspectos éticos (CONTESINI et al., 2018).

Proteases microbianas respondem por cerca de 60% das enzimas comercializadas mundialmente, em um mercado anual de dezenas de bilhões de dólares (KASANA et al., 2011). Dentre os diferentes grupos de proteases, as serino proteases são indicadas como sendo as mais comumente produzidas por microrganismos, bem como são as mais demandadas industrialmente. As serino proteases, caracterizadas por possuírem um resíduo de serina no sítio ativo, o qual é fundamental para a catálise (BANERJEE; RAY, 2017), comumente apresentam massa molecular entre 18 e 35 kDa, temperatura ótima na faixa de 50 a 70 °C e pH ótimo entre 6 e 11 (AGUILAR; SATO, 2018). A extensa utilização das serino

proteases reside, especialmente, na sua diversidade bioquímica e no amplo espectro de substratos proteicos passíveis de hidrólise (KAMAL et al., 2017).

2.1.1 Microrganismos produtores de proteases extracelulares

Microrganismos habitam locais onde as fontes nutricionais e energéticas são comumente macromoleculares. Portanto, necessitam da atuação de diferentes enzimas extracelulares, incluindo proteases, para realizar a quebra destas macromoléculas em moléculas menores passíveis de absorção celular (BANERJEE; RAY, 2017). A prospecção de microrganismos apresenta-se como um valioso recurso para inovações biotecnológicas, representando importante papel na busca por proteases adequadas para diferentes propósitos (KASANA et al., 2011).

Diversas investigações reportam o isolamento de microrganismos proteolíticos a partir de diferentes ambientes, naturais ou antrópicos. Dentre os fungos produtores de proteases podem ser citados *Engyodontium album* BTMFS10, isolado de sedimentos marinhos (CHELLAPPAN et al., 2006), *Beauveria felina* (AGRAWAL et al., 2005), *Penicillium godlewskii* SBSS 25 (SINDHU et al., 2009) e *Trichoderma harzianum* (BAGEWADI et al., 2018), isolados de solos, *Aspergillus clavatus* ES1, isolado de águas residuais (HAJJI et al., 2007) e *Penicillium* sp. LCJ228, isolado de resíduos de moinhos de arroz (BENLUVANKAR et al., 2015).

Dentre as bactérias produtoras de proteases estão *Chryseobacterium* sp. kr6, isolada do efluente de uma indústria de processamento de aves (RIFFEL et al., 2007), *Pseudomonas aeruginosa* BC1, isolada de águas residuárias de curtume (SIVAPRAKASAM et al., 2011), *Pseudomonas fluorescens*, isolada do solo contaminado com resíduos da indústria da carne (KALAIARASI; SUNITHA, 2009), bem como inúmeras outras (SHARMA et al., 2017).

Contudo, a maior parte das bactérias prospectadas para a produção de proteases pertence ao gênero *Bacillus*, que compreende bactérias Gram-positivas em forma de bastonete, anaeróbias facultativas ou aeróbias e formadoras de endósporos (CONTESINI et al., 2018). A produção de proteases extracelulares vem sendo reportada, por exemplo, para linhagens de *Bacillus subtilis* (FERRAREZE et al., 2016; GIRI et al., 2011; ZHANG et al., 2014; SANGHVI et al., 2016), *Bacillus pumilus* (FAKHFAKH-ZOUARI et al., 2010; RAJPUT et al., 2010), *Bacillus licheniformis* (JELLOULI et al., 2011; TIWARY; GUPTA, 2010), *Bacillus circulans*

(JASWAL et al., 2008) e *Bacillus cereus* (KOTLAR et al., 2015; ASHA; PALANISWAMY, 2018).

Neste sentido, a maior parte das proteases disponíveis comercialmente são obtidas a partir de *Bacillus* spp. (KAMAL et al., 2017). Contribuem para este cenário o fato de estas bactérias apresentarem elevadas taxas de crescimento, bem como a capacidade de secretar expressivas quantidades de proteínas, incluindo proteases, para o meio extracelular (CONTESINI et al., 2018). Tais características são desejáveis para a produção de proteases em larga escala, tanto pela eficiência dos bioprocessos para a obtenção destas enzimas (KAMAL et al., 2017), quanto pela maior simplicidade na recuperação de enzimas extracelulares a partir dos meios de cultivo microbiano, contribuindo para a redução considerável dos custos de processamento (HARWOOD; CRANENBURGH, 2008).

2.1.2 Produção de proteases microbianas

Há uma demanda cada vez maior por proteases microbianas em virtude de sua ampla gama de aplicações e, devido à isso, o aumento da produção de proteases tem representado um constante desafio para as indústrias de enzimas (SHARMA et al., 2017). Obviamente, o primeiro fator a ser considerado é a seleção de microrganismos com capacidade de produzir estas enzimas (KASANA et al., 2011).

Os processos microbianos para a obtenção de proteases, assim como de outras enzimas e bioprodutos, são tecnologicamente denominados de fermentações. Estes bioprocessos podem ser conduzidos cultivando microrganismos em meios líquidos, com altos teores de água disponível, conhecidos como fermentações submersas (SmF) ou então através de fermentações em estado sólido (SSF), bioprocessos nos quais os microrganismos são cultivados em meios com conteúdo muito baixo de água livre (AGUILAR; SATO, 2018; THOMAS et al., 2013).

As SSF são utilizadas em pequena extensão a nível industrial. Embora possam beneficiar o rendimento e diminuir os custos de produção de enzimas e outros metabólitos microbianos, o controle das condições do processo é complicado, o tempo necessário para obtenção dos produtos desejados é usualmente maior do que na SmF e, ainda, esta abordagem se restringe a microrganismos capazes de se

desenvolver em condições de diminuída disponibilidade de água (SOCCOL et al., 2017; FARINAS, 2015; SHARMA et al., 2017).

As SmF são as principais formas de condução de bioprocessos a nível industrial. Possuem, em relação às SSF, vantagens relacionadas ao controle do bioprocessamento, redução da possibilidade de contaminações e, aparentemente, maior facilidade na recuperação dos produtos desejados. Além disso, considerando que a maioria das proteases comerciais é produzida por bactérias e que estes microrganismos normalmente necessitam de elevadas quantidades de água livre para suas atividades fisiológicas e metabólicas, a produção industrial de proteases, bem como de outras enzimas e bioprodutos bacterianos, é usualmente realizada através de SmF (KAMAL et al., 2017; CONTESINI et al., 2018).

A composição do meio de cultura e as condições de operação do bioprocessamento são fundamentais para atingir a máxima produção de proteases. Os substratos orgânicos e componentes inorgânicos dos meios usados para o crescimento microbiano, suas concentrações, além do pH, temperatura, aeração, agitação e tempo de incubação, são fatores que, reconhecidamente, afetam a produção e o rendimento de proteases, uma vez que costumam exercer efeitos diretos sobre os microrganismos produtores (BHUNIA et al., 2012, 2013; RATHOD; PATHAK, 2016; SHARMA et al., 2017; AGUILAR; SATO, 2018).

Particularmente, constantes investigações são realizadas no intuito de diminuir os custos de produção de enzimas. O uso de resíduos agroindustriais como substratos alternativos para a produção de proteases microbianas representa uma abordagem interessante sob perspectivas econômicas e ecológicas (KASANA et al., 2011; RATHOD; PATHAK, 2016). A bioconversão microbiana, neste sentido, representa uma forma de manejo de resíduos que posteriormente pode tornar-se inconvenientes, devido a problemas de disposição final, vindo a causar poluição. Ao mesmo tempo, estes resíduos orgânicos apresentam-se como matérias-primas de elevada disponibilidade e de baixo custo que podem ser valorizadas através da bioconversão microbiana obtendo-se produtos de valor agregado (BRANDELLI, 2008; LEMES et al., 2016).

Dentre a enorme variedade de resíduos agroindustriais gerados, destacam-se as penas de frango, constituídas, em cerca de 90% (m/m), por queratinas, que são proteínas fibrosas e insolúveis. As penas apresentam elevada recalcitrância ambiental devido à estabilidade e estrutura compacta das queratinas, fornecida

especialmente pela reticulação das cadeias polipeptídicas por ligações dissulfeto, mas também por interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (BRANDELLI et al., 2015). A degradação das penas por microrganismos, denominados queratinolíticos, depende, pelo menos em parte, da produção de proteases extracelulares. Assim, as penas podem ser usadas como substratos para o crescimento microbiano e as proteases recuperadas a partir dos cultivos (DAROIT; BRANDELLI, 2014).

2.1.3 Purificação e propriedades de proteases microbianas

A partir da produção de proteases extracelulares surge a necessidade de recuperá-las, concentrá-las e purificá-las. Diversas técnicas vêm sendo usadas para recuperar estas proteases a partir de meios de cultivo que consistem de misturas heterogêneas de proteínas/enzimas. Após a produção de proteases através de SmF, usualmente é aplicada centrifugação (ou filtração) para remoção da biomassa microbiana e potenciais resíduos de substratos, de forma que o sobrenadante (ou filtrado) contenha as proteases de interesse (MOKASHE et al., 2018).

As proteases presentes nos cultivos ou sobrenadantes de cultivo são então submetidas a processos de concentração. Dentre os processos mais utilizados para esta finalidade há a precipitação de proteínas utilizando sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (RAZZAQ et al., 2019). Este sal apresenta alta solubilidade, baixo custo relativo e elevada disponibilidade. De forma simplificada, a partir de sua adição aos sobrenadantes dos cultivos, os íons deste sal tornam-se solvatados pela água e, em elevadas concentrações, atuam na remoção de moléculas de água que interagem de forma organizada com regiões hidrofóbicas superficiais das proteínas. A exposição destas regiões é responsável por interações hidrofóbicas entre proteínas, causando sua agregação e precipitação. O fracionamento entre proteínas alvo e não-alvo é usualmente alcançado fazendo uso de diferentes faixas de saturação de sulfato de amônio (WINGFIELD, 2001; BURGESS, 2009).

Subsequentemente, técnicas de cromatografia líquida, como gel-filtração, troca iônica e interação hidrofóbica, são aplicadas isoladamente ou em sequência, para a purificação. Dentre estas técnicas, a cromatografia líquida de gel-filtração é uma das mais comumente empregadas (BANERJEE; RAY, 2017). Em uma coluna de gel-filtração há uma fase estacionária, representada por uma matriz porosa de porosidade definida e, uma fase móvel, representada pela solução eluente. A partir

da aplicação de uma amostra nesta coluna, moléculas maiores que os poros da matriz serão eluídas mais rapidamente, enquanto que moléculas menores podem penetrar nos poros, o que retarda sua migração. Assim, as moléculas são eluídas em ordem decrescente de tamanho molecular (Ó'FÁGÁIN et al., 2011).

Industrialmente, para enzimas usadas em grandes quantidades, os níveis de purificação não são necessariamente elevados. Já para proteases usadas em setores farmacêuticos, por exemplo, elevados níveis de pureza são demandados (BANERJEE; RAY, 2017).

Após a purificação, parcial ou total, as proteases devem ser caracterizadas bioquimicamente. Isto inclui avaliações quanto aos efeitos de temperatura, pH, sais, solventes e inibidores sobre a atividade e estabilidade enzimáticas. Diferentes espécies de *Bacillus* são capazes de produzir distintas enzimas proteolíticas extracelulares, que apresentam massas moleculares na faixa de 27-71 kDa. Quanto ao pH de atuação, são comumente classificadas como proteases neutras ou alcalinas, com pH ótimo entre 6 e 10. No que se refere à temperatura, a atividade máxima é observada entre 37 °C e 60 °C (CONTESINI et al., 2018).

Dentre as proteases majoritárias produzidas por *Bacillus* estão as serino proteases. Estas enzimas necessitam, normalmente, de íons metálicos divalentes (como Ca^{2+} e Mg^{2+}) para atividade e, especialmente, para manutenção de sua conformação ativa em temperaturas elevadas (KAMAL et al., 2017). Investigações acerca da especificidade da protease frente a diferentes substratos também são fundamentais vislumbrando seu uso. É considerado positivo, do ponto de vista industrial, o fato de as serino proteases de *Bacillus* serem usualmente capazes de hidrolisar diversos substratos proteicos (GUPTA et al., 2002a; SHARMA et al., 2017; MOKASHE et al., 2018). As propriedades das proteases definem, em grande parte, suas potenciais aplicações, bem como as condições ótimas ou limitações para processos biocatalíticos (SILVA, 2017).

2.1.4 Aplicações de proteases microbianas

O mercado de enzimas ampliou-se durante a década de 1960 com a comercialização de proteases e, atualmente, estas enzimas representam o principal grupo de biocatalisadores utilizados industrialmente. As proteases microbianas são consideradas promissoras para processos biocatalíticos, com aplicações em

diversas áreas, especialmente naquelas onde é demandada a hidrólise de proteínas (AGUILAR; SATO, 2018).

Proteases microbianas vêm sendo amplamente utilizadas na formulação de detergentes. O uso de proteases pela indústria de detergentes representa cerca de 20% do total de enzimas comercializadas anualmente (RAZZAQ et al., 2019). Dentre os detergentes que contêm proteases destacam-se especialmente aqueles utilizados para a lavagem de roupas; contudo, estas enzimas também são ingredientes de detergentes usados em lavadoras de louça e detergentes de uso industrial (SHARMA et al., 2019). No caso da lavagem de roupas, as proteases atuam removendo diversos tipos de manchas de composição proteica, como sangue, ovos, suor, molhos, leite, dentre outras. Neste contexto, detergentes à base de proteases demonstram performance superior de limpeza e remoção de sujidades em comparação com detergentes de composição puramente química (REDDY et al., 2017; BHANGE et al., 2016; GURUMALLESH et al., 2019; RAZZAQ et al., 2019).

Na indústria coureira, proteases são especialmente usadas na etapa de depilação do couro, substituindo agentes químicos usados no processo tradicional. Na depilação química, a ação de agentes como o sulfeto de sódio e cal ocasiona a gelatinização dos pelos. Além da toxicidade destes reagentes, os efluentes gerados possuem elevada demanda bioquímica de oxigênio e potencial poluente, sendo necessários tratamentos posteriores. O uso de proteases microbianas capazes de atacar proteínas que constituem os folículos pilosos, mas inativas sobre o colágeno (principal componente dos couros), faz com que a remoção mecânica dos pelos intactos seja realizada com facilidade, tornando o processo mais sustentável. Além disso, investigações demonstram que o couro depilado por proteases apresenta maior qualidade do que aquele depilado pela via química (ABRAHAM et al., 2014; VERMA et al., 2017; BAGEWADI et al., 2018; KALAUKUMARI et al., 2019).

Dentre as aplicações de proteases microbianas está a recuperação de prata a partir de filmes fotográficos e de raios-X. Como estes filmes são constituídos por uma matriz de gelatina contendo até 2% (m/m) de prata, as proteases podem atuar na degradação da gelatina, liberando a prata que pode ser recuperada. Esta estratégia é considerada útil e segura quando comparada aos métodos físico-químicos comumente empregados (MOKASHE et al., 2018; SHARMA et al., 2019).

Ainda, proteases vêm sendo usadas na indústria têxtil, como na degomagem da seda. Neste processo, as enzimas proteolíticas hidrolisam a sericina, proteína

que recobre a periferia das fibras brutas da seda. Tradicionalmente, altas temperaturas e pHs alcalinos são empregadas em conjunto com agentes químicos para a remoção da sericina, o que demanda elevadas quantidades de água e energia e resulta na degradação parcial da fibroína (proteína que forma as fibras da seda) e em efluentes ambientalmente problemáticos. Assim, a remoção enzimática da sericina resulta na manutenção da qualidade das fibras devido às condições moderadas de remoção desta (GUPTA et al., 2002b; KAMAL et al., 2017). No caso da lã, a hidrólise parcial resulta na modificação das fibras de forma a controlar seu encolhimento durante o tingimento e lavagens (VIDMAR; VODOVNIK, 2018).

Na indústria cosmética e farmacêutica, proteases microbianas encontram utilidade como agentes de depilação (SANGHVI et al., 2016), no tratamento da acne e calos, podendo atuar como facilitadoras da passagem de drogas antifúngicas através de epitélio queratinizado (BRANDELLI et al., 2010), e também na dissolução de coágulos sanguíneos como potenciais tratamentos de doenças cardiovasculares (DE SOUZA et al., 2016). Proteases tolerantes a solventes orgânicos podem realizar a síntese de peptídeos em ambientes reacionais apolares, demonstrando importância na indústria química (CONTESINI et al., 2018; RAZZAQ et al., 2019).

Na indústria de alimentos, proteases são usadas no amaciamento enzimático de carnes e também na hidrólise de caseínas para a coagulação do leite na manufatura de queijos. Podem atuar na modificação do glúten, visando obter produtos (como pães e biscoitos) com propriedades viscoelásticas distintas. A hidrólise incrementa a digestibilidade e valor nutricional de proteínas alimentares e, também vem sendo aplicada na redução do potencial alergênico destas proteínas. A hidrólise controlada pode ser empregada para alterar propriedades tecno-funcionais de proteínas, aumentando a solubilidade, a capacidade de formar géis, emulsões e espumas, conferindo vantagens para uso em produtos alimentícios (RAVEENDRAN et al., 2018; TAVANO et al., 2018; SHARMA et al., 2019).

Hidrolisados de proteínas alimentares, produzidos pela atuação de proteases, podem também demonstrar diversas atividades biológicas (DALIRI et al., 2017; AGUILAR; SATO, 2018; LORENZO et al., 2018). Tal constatação, além de explicitar aspectos positivos da aplicação de hidrolisados proteicos bioativos para a indústria de alimentos, também possui potenciais implicações para a indústria farmacêutica, por exemplo, no desenvolvimento de fármacos (CONTESINI et al., 2018).

2.2 HIDROLISADOS PROTEICOS BIOATIVOS

Proteínas são tradicionalmente consideradas como fontes de aminoácidos e energia para processos fisiológicos e metabólicos essenciais, relacionados ao crescimento e à manutenção das funções celulares e corporais. No entanto, a hidrólise destas proteínas vem sendo amplamente investigada uma vez que os hidrolisados produzidos podem apresentar importantes funções biológicas, que são atribuídas aos peptídeos originados durante a hidrólise (SARMADI; ISMAIL, 2010).

Embora alguns peptídeos bioativos possam existir naturalmente, a ampla maioria dos peptídeos bioativos conhecidos são fragmentos proteicos liberados através da hidrólise de proteínas, ou seja, estes peptídeos não apresentam atividades biológicas enquanto parte da proteína precursora. Proteínas alimentares de origem animal, como aquelas de carnes e ovos e as caseínas do leite, e de origem vegetal, como as proteínas de cereais e da soja, são reportados como fontes de peptídeos bioativos (SÁNCHEZ; VÁZQUEZ, 2017).

A produção de hidrolisados bioativos a partir de proteínas pode ser realizada, basicamente, por hidrólise enzimática, usando enzimas proteolíticas, ou através de bioprocessos microbianos, onde o microrganismo secreta proteases durante seu crescimento, que atuam na hidrólise do substrato proteico (SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011). No caso de processos microbianos, a produção de hidrolisados pode apresentar problemas de reprodutibilidade, visto que a atividade metabólica, a produção de diferentes enzimas e mesmo os níveis de cada enzima produzida são de difícil controle, fazendo com que os perfis e quantidades de peptídeos bioativos não possa ser garantida (DALIRI et al., 2017).

Assim, na perspectiva tecnológica, a forma mais comum para a obtenção de hidrolisados e peptídeos bioativos é a hidrólise enzimática, sendo utilizadas proteases de origem animal, vegetal ou microbiana (SARMADI; ISMAIL, 2010). Particularmente, a maior parte dos peptídeos vem sendo produzida usando enzimas gastrointestinais, como pepsina e tripsina; entretanto, os custos destas enzimas são relativamente elevados, demandando o uso de fontes mais baratas destas enzimas, como aquelas derivadas de microrganismos (AGUILAR; SATO, 2018; AGYEI; DANQUAH, 2011).

Para a determinação de bioatividades, tanto os tipos de aminoácidos que constituem o peptídeo quanto a sequência dos resíduos de aminoácidos no peptídeo

são relevantes. Logo, tanto o substrato proteico a ser hidrolisado quanto a protease a ser empregada na hidrólise afetam diretamente as características dos peptídeos liberados e, com isso, potenciais bioatividades (ZOU et al., 2016; SÁNCHEZ; VÁZQUEZ, 2017). Neste contexto, a utilização de enzimas proteolíticas distintas das proteases gastrointestinais (tripsina, pepsina, quimotripsina), o que inclui as proteases microbianas, é ferramenta interessante na potencial produção de novos hidrolisados e peptídeos bioativos (TAVANO et al., 2018).

Dentre as atividades biológicas demonstradas por hidrolisados proteicos e peptídeos estão os potenciais antioxidante, antidiabético e anti-hipertensivo, que exibem importantes aplicações, especialmente no contexto da saúde humana (DALIRI et al., 2017; LORENZO et al., 2018).

2.2.1 Capacidade antioxidante

Radicais livres são constantemente produzidos em condições fisiológicas normais. No entanto, a produção em excesso destes radicais, de forma a superar a capacidade dos sistemas antioxidantes do organismo em inativá-los, caracteriza o estresse oxidativo. Neste cenário, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio reagem com biomoléculas, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, modificando sua estrutura e função. O estresse oxidativo contribui de forma importante para diversas doenças crônicas, como a aterosclerose e doenças vasculares relacionadas, câncer, e doenças neurodegenerativas (CASTRO; FREEMAN, 2001).

Hidrolisados proteicos e os peptídeos neles contidos podem apresentar capacidade antioxidante, exercendo sua atividade através de dois mecanismos principais, quais sejam, a transferência de hidrogênio e a doação de elétrons para moléculas oxidantes (LORENZO et al., 2018). A inativação de radicais livres é usualmente avaliada através de experimentos *in vitro*. Dentre os diversos testes utilizados, podem ser destacados a inativação do radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico (ABTS) e do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), que resulta da capacidade de moléculas antioxidantes em transferir elétrons e, assim, estabilizar estes radicais (HUANG et al., 2005).

O potencial antioxidante de hidrolisados proteicos e peptídeos também pode derivar da capacidade em quelar e/ou reduzir íons metálicos (NWACHUKWU; ALUKO, 2019). Um dos ensaios *in vitro* empregados mensura a capacidade do

antioxidante em quelar íons ferrosos (Fe^{2+}) (ALAM et al., 2013). A relevância da capacidade de antioxidantes em quelar Fe^{2+} está relacionada à atuação destes íons como pró-oxidantes, que catalisam a geração de radicais hidroxila a partir de peróxido de hidrogênio através da reação de Fenton. Os radicais hidroxila, por sua vez, são altamente reativos e contribuem para danos oxidativos e peroxidação lipídica em sistemas biológicos (AYALA et al., 2014). Quanto ao poder redutor, este está associado à habilidade do antioxidante em reduzir compostos intermediários oxidados que podem contribuir para peroxidação lipídica (LIU et al., 2017). Neste contexto, testes *in vitro* usualmente avaliam a capacidade dos antioxidantes em reduzir íons férricos (Fe^{3+}) (ALAM et al., 2013).

As relações entre a estrutura e a atividade antioxidante dos peptídeos são foco de constantes investigações. No entanto, algumas propriedades parecem ser comuns a diferentes peptídeos antioxidantes. Peptídeos antioxidantes usualmente possuem entre 3 e 15 resíduos de aminoácidos, com massa molecular entre 500 a 1800 Da. Aminoácidos hidrofóbicos, como valina e leucina, são frequentes na porção *N*-terminal dos peptídeos, bem como resíduos de prolina, histidina, tirosina, triptofano, metionina e cisteína em sua sequência (SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011; ZOU et al., 2016; NWACHUKWU; ALUKO, 2019).

As atividades antioxidantes de hidrolisados proteicos e peptídeos são relevantes considerando a ação deletéria de radicais livres e metais pró-oxidantes em sistemas biológicos e alimentares. Além da relevância fisiológica, a peroxidação lipídica também representa significativo problema no contexto da indústria alimentícia, visto que resulta na diminuição da qualidade, como alterações na textura, cor, sabor, odor dos alimentos e até mesmo de sua segurança (SOHAIB et al., 2017; TAVANO et al., 2018).

Adicionalmente, efeitos adversos à saúde humana vêm sendo reportados para antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos. Desta forma, o interesse acerca de hidrolisados proteicos e peptídeos com capacidades antioxidantes também resulta da crescente demanda dos consumidores por alimentos e ingredientes naturais, nutritivos e funcionais, da preocupação com o uso de aditivos sintéticos e do reconhecimento da conexão entre dieta e saúde humana (LORENZO et al., 2018).

2.2.2 Potencial anti-hipertensivo

Globalmente, cerca de 1,4 bilhões de pessoas sofrem com hipertensão, quadro que pode ocasionar graves doenças cardiovasculares. Acidentes vasculares cerebrais e doenças isquêmicas do coração, responsáveis por cerca de 25% do total de mortes anuais no mundo, podem ser atribuídos de forma substancial à hipertensão arterial (MILLS et al., 2016).

A pressão arterial é controlada por diversas rotas bioquímicas que interagem entre si, sendo que o sistema renina-angiotensina desempenha papel crucial nesta regulação. Neste sistema, o angiotensinogênio é hidrolisado pela renina, liberando angiotensina I. Subsequentemente, a enzima conversora de angiotensina (ACE), uma protease produzida especialmente no endotélio vascular, cliva a angiotensina I resultando em angiotensina II, um peptídeo com potente atividade vasoconstritora (HONG et al., 2008). A ACE também é capaz de degradar a bradicinina, uma molécula com ação vasodilatadora. Assim, dentre os alvos de terapias contra a hipertensão estão fármacos capazes de inibir a ação da ACE (SPARKS et al., 2014).

Investigações acerca do potencial anti-hipertensivo de hidrolisados proteicos e peptídeos, usualmente, avaliam a capacidade de inibir, *in vitro*, a atuação da ACE (BECHAUX et al., 2019). Neste sentido, hidrolisados produzidos a partir de diversos substratos proteicos de origem animal ou vegetal, através da ação de diferentes enzimas proteolíticas, demonstram habilidade em inibir a ACE (MCCARTHY et al., 2013; MARTIN; DEUSSEN, 2017).

Comumente, peptídeos com capacidade de inibir a ACE possuem entre 2 e 12 aminoácidos. A região *N*-terminal destes peptídeos é caracteristicamente constituída por aminoácidos hidrofóbicos, particularmente, aqueles com cadeias laterais alifáticas (glicina, leucina, isoleucina, valina). Aminoácidos com cadeia lateral cíclica ou aromática são comuns na porção *C*-terminal dos peptídeos inibidores (IWANIAK et al., 2014; BECHAUX et al., 2019). A maior parte destes peptídeos atua como substrato competitivo da ACE. Neste sentido, a ligação ao sítio ativo da enzima é definida, majoritariamente, pelos aminoácidos na região *C*-terminal dos peptídeos (RYAN et al., 2011; MARTIN; DEUSSEN, 2017).

Considerando que a maior parte dos fármacos disponíveis usados como inibidores da ACE para o tratamento da hipertensão arterial pode induzir efeitos negativos no paciente, incluindo tosse seca e angioedema, os peptídeos obtidos a

partir da hidrólise de proteínas alimentares constituem-se como biomoléculas de interesse, com limitados efeitos colaterais (BECHAUX et al., 2019).

2.2.3 Potencial antidiabético

O diabetes tipo 2 é uma síndrome metabólica caracterizada por níveis anormalmente elevados de glicose no sangue, ocasionada pela redução da produção de insulina pelas células β pancreáticas e pela resistência à insulina nos tecidos. Os principais fatores que levam ao diabetes tipo 2 são a dieta inadequada, rica em carboidratos e o estilo de vida sedentário; neste sentido, a obesidade está frequentemente relacionada à maior incidência deste tipo de diabetes (TAN et al., 2019). Esta síndrome, que acomete aproximadamente 380 milhões de pessoas no mundo (LIU et al., 2019), está relacionada a diversas comorbidades, incluindo doenças cardiovasculares que podem culminar em derrames cerebrais e infartos do miocárdio (DEFRONZO et al., 2015).

Após uma refeição, a secreção de insulina é estimulada. Cerca de 70% da insulina secretada pelas células β do pâncreas depende da liberação de incretinas, grupo de hormônios produzidos por células intestinais, representados principalmente pelo peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP1) e pelo polipeptídeo inibitório gástrico (GIP). O GLP1 também diminui a produção de glucagon pelas células α do pâncreas, contribuindo para a não elevação dos níveis de glicose no sangue (DEFRONZO et al., 2015).

No diabetes tipo 2, entretanto, embora as incretinas continuem a ser produzidas normalmente, há severa diminuição (cerca de 50%) do seu efeito estimulatório sobre a secreção de insulina pelas células β do pâncreas (DEFRONZO et al., 2015). Somado a este fator, as incretinas GIP e GLP1 são rapidamente degradadas pela enzima dipeptidil-peptidase IV (DPP IV), resultando na perda de suas propriedades insulínótropas. Desta forma, a inibição da DPP IV pode proteger GIP e GLP1 da degradação enzimática, prolongando sua meia-vida e, com isso, sua ação (NONGONIERMA; FITZGERALD, 2013).

Inibidores desta enzima são fármacos relativamente recentes empregados no controle glicêmico em indivíduos com diabetes tipo 2 (TAN et al., 2019). Considerando que inibidores sintéticos da DPP IV são associados a alguns efeitos adversos, como reações alérgicas e distúrbios gastrointestinais, esforços são

direcionados na busca por inibidores naturais. Neste contexto, hidrolisados e peptídeos derivados da hidrólise de proteínas alimentares vêm sendo sugeridos como potenciais inibidores da DPP IV (LIU et al., 2019).

Peptídeos inibidores da DPP IV apresentam 2 a 7 resíduos de aminoácidos, massa molecular comumente inferior a 1 kDa, contendo prolina ou alanina na penúltima posição anterior à extremidade *N*-terminal, onde a presença de aminoácidos hidrofóbicos ou básicos incrementam a ligação ao sítio ativo da enzima e a suscetibilidade do substrato para clivagem. Assim, peptídeos podem atuar, especialmente (mas não exclusivamente), como inibidores competitivos da DPP IV (POWER et al., 2014). Logo, peptídeos derivados de proteínas alimentares apresentam-se como potenciais estratégias complementares na regulação da glicemia em indivíduos com diabetes tipo 2 e mesmo em indivíduos pré-diabéticos.

Neste sentido, é relevante a busca por inibidores da DPP IV, não apenas peptídeos ativos purificados, mas também hidrolisados e misturas de peptídeos que podem exibir, inclusive, efeitos mais potentes (LIU et al., 2019).

2.2.4 Hidrolisados de proteína isolada de soja (PIS)

A soja (*Glycine max*) é uma leguminosa cujos grãos possuem elevada relevância econômica, provendo proteínas de alta qualidade a custos relativamente baixos (SINGH et al., 2014). De fato, atualmente a soja é uma das mais importantes fontes de proteína vegetal para nutrição humana e animal (SUN, 2011).

Grãos de soja contêm cerca de 40% de proteína (em base seca), sendo que 80% deste total são constituídos pelas proteínas glicinina e β -conglucina (NISHINARI et al., 2014). Todos os aminoácidos essenciais são encontrados nas proteínas da soja e o valor nutricional destas proteínas aproxima-se das proteínas animais de elevado valor biológico, como as caseínas do leite e proteínas de ovos (SINGH et al., 2014). Ainda, a soja contém componentes benéficos do ponto de vista fisiológico, como saponinas e isoflavonas, que atuam na redução dos níveis de colesterol e dos riscos de doenças cardiovasculares e câncer (SINGH et al., 2017).

A partir do processamento da soja é possível obter diferentes produtos, dentre os quais está a PIS, que apresenta pelo menos 90% de proteína e é amplamente utilizada na indústria de alimentos. Além da relevância nutricional, proteínas da soja são ingredientes úteis em diversos alimentos processados devido às suas

propriedades tecnológicas (funcionais), como a habilidade de formar e estabilizar emulsões, formar géis, capacidade de retenção de água e de gorduras, fornecendo assim características sensoriais desejadas (SINGH et al., 2008; NISHINARI et al., 2014). Neste contexto, a hidrólise controlada de proteínas da soja é investigada no intuito de otimizar estas propriedades tecno-funcionais (SUN, 2011; KEMPKA et al., 2014; CHEN et al., 2016; LI et al., 2016; MEINLSCHMIDT et al., 2016).

As proteínas da soja também são reconhecidas como potenciais fontes de peptídeos bioativos (CHATTERJEE et al., 2018). A hidrólise destas proteínas pode ocorrer através de processos microbianos (fermentações), onde os microrganismos produzem as proteases extracelulares que irão liberar peptídeos a partir das proteínas da soja. Neste sentido, diversos produtos fermentados à base de soja são consumidos há séculos em países asiáticos (SANJUKTA; RAI, 2016). No entanto, a produção de hidrolisados de proteínas de soja usando enzimas proteolíticas representa uma abordagem mais eficiente no sentido do melhor controle dos processos, menores tempos de hidrólise e a obtenção de sequências peptídicas específicas (FENG et al., 2013; SINGH et al., 2014; CONTI et al., 2019).

Diversas bioatividades, como potenciais antioxidante, anti-hipertensivo e antidiabético são reportados, principalmente *in vitro*, para hidrolisados de proteínas da soja obtidos através de hidrólise enzimática (SINGH et al., 2014; CHATTERJEE et al., 2018; ZANI et al., 2018). Proteases de origem animal, vegetal ou microbiana são comumente empregadas na produção de hidrolisados a partir destas proteínas, com exitosos resultados no incremento de bioatividades (Tabela 1).

É necessário notar que a hidrólise não necessariamente resulta em incremento dos potenciais bioativos. A hidrólise de PIS por enzimas comerciais (quimotripsina e Flavourzyme), por exemplo, resultou na diminuição do potencial antioxidante, mensurado através da captura do radical DPPH, em comparação à PIS não hidrolisada (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2013). As capacidades antioxidante e anti-hipertensiva da PIS, avaliadas *in vitro*, não foram alteradas pela hidrólise usando Alcalase, uma preparação enzimática comercial (HORAX et al., 2017).

Dentre as proteases produzidas por microrganismos, preparações comerciais são aparentemente mais usadas (Tabela 1). Por outro lado, informações acerca da aplicação de proteases microbianas não comerciais para a produção de hidrolisados bioativos de proteínas da soja são relativamente escassas (ZHANG et al., 2010; CASTRO; SATO, 2014a). Neste contexto, novas enzimas proteolíticas e/ou

preparações de proteases microbianas podem ser úteis, uma vez que suas especificidades podem ser aplicadas na produção de hidrolisados com características singulares (OLIVEIRA et al., 2015).

Tabela 1 - Proteases usadas na hidrólise de proteína isolada de soja e bioatividades demonstradas pelos hidrolisados.

Origem da Protease	Bioatividade(s) <i>in vitro</i>	Referência
<i>Vegetal</i>		
Látex de frutos de <i>Maclura pomifera</i> (parcialmente purificada)	Antioxidante	JARA et al. (2018)
Frutos de <i>Bromelia karatas</i> (parcialmente purificada)	Antioxidante	MEZA-ESPINOZA et al. (2018)
Frutos de <i>Bromelia pinguin</i> (parcialmente purificada)	Antioxidante	
<i>Animal</i>		
Pepsina (comercial) + Pancreatina (comercial)	Antioxidante	RANAMUKHAARACHCHI et al. (2013, 2017); ROBLET et al. (2012)
Pâncreas suíno (Corolase PP; comercial)	Antioxidante, Anti-hipertensiva	COSCUETA et al. (2016); GUAN et al. (2018)
<i>Microbiana</i>		
<i>Aspergillus oryzae</i> LBA 01 (parcialmente purificada)	Antioxidante	CASTRO; SATO (2014a)
<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6 (parcialmente purificada)	Antioxidante	OLIVEIRA et al. (2014, 2015)
<i>Aspergillus oryzae</i> (Flavourzyme 500 L; comercial)	Antioxidante	CASTRO; SATO (2014a,b, 2015)
<i>Bacillus licheniformis</i> (Alcalase 2.4L; comercial)	Antioxidante	PARK et al. (2010); CASTRO; SATO (2014a, 2015); ZHANG et al. (2018a,b)
YeastMax A (comercial)	Antioxidante	CASTRO; SATO (2015)
<i>Aspergillus oryzae</i> (Validase FP; comercial)	Antioxidante	ZHANG et al. (2010)
<i>Bacillus licheniformis</i> (comercial)	Antioxidante	
<i>Bacillus subtilis</i> (comercial)	Antioxidante	
<i>Aspergillus oryzae</i> (Prozyme 2000P; comercial)	Anti-hipertensiva	DALIRI et al. (2019)
Protease alcalina (comercial)	Antioxidante, Anti-hipertensiva, Antidiabética	WANG et al. (2019)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo estão apresentados sob a forma de artigo científico, apresentado na Seção 3.1 identificada como Resultados I. O artigo (Seção 3.1) tem como título “Caracterização de uma protease e seu potencial para a produção de hidrolisados bioativos de proteína de soja”.

3.1 RESULTADOS I

CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEASE E SEU POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS BIOATIVOS DE PROTEÍNA DE SOJA

RESUMO

Contínuos esforços são dedicados à prospecção de proteases microbianas devido à sua relevância industrial. Especial interesse reside na produção de hidrolisados proteicos, baseado no reconhecimento de que a hidrólise enzimática pode liberar peptídeos bioativos. Com este trabalho, objetivou-se purificar parcialmente e caracterizar uma protease de *Bacillus* sp. CL 18, que foi empregada na obtenção de hidrolisados de proteína isolada de soja (PIS). A purificação parcial, realizada através de precipitação com sulfato de amônio (saturação de 25-50%) e cromatografia de gel filtração, resultou em fator de purificação de 60,7 vezes (40.593 U/mg proteína), com rendimento de 21,3% (32.150 U). A protease parcialmente purificada (PPP; 1.565 U/mL) apresentou atividade ótima a 51-59 °C e pH 7,4-8,8. A PPP demonstrou características de serino protease dependente de Ca^{2+} para termoatividade e termoestabilidade. A inativação térmica obedeceu à cinética de primeira ordem. A maior termoestabilidade na presença de Ca^{2+} foi demonstrada termodinamicamente por elevações da energia de ativação (E_a) e da energia livre ($\Delta G^\#$) para a inativação. Dentre diferentes substratos, a PPP hidrolisou preferencialmente caseína e PIS. A hidrólise da PIS ocasionou incremento nas bioatividades avaliadas, em comparação à PIS não hidrolisada. Os hidrolisados demonstraram capacidade antioxidante através da captura de radicais sintéticos e da habilidade de reduzir Fe^{3+} . Adicionalmente, foram capazes de inibir, *in vitro*, as atividades da enzima dipeptidil peptidase IV (DPP IV) e da enzima conversora de angiotensina (ACE), sugerindo potenciais antidiabéticos e anti-hipertensivos, respectivamente. A PPP demonstrou ser útil na produção de hidrolisados proteicos bioativos multifuncionais, com potenciais aplicações na indústria de alimentos.

Palavras-chave: Enzima. Caracterização bioquímica. Estabilidade térmica. Hidrólise. Bioatividade.

ABSTRACT

Continuous efforts are devoted to prospecting microbial proteases due to their industrial relevance. Special interest lies in the production of protein hydrolysates, based on the recognition that enzymatic hydrolysis can release bioactive peptides. Our goal was to partially purify and characterize a protease from *Bacillus* sp. CL 18, which was then applied to obtain soy protein isolate

(SPI) hydrolysates. Partial purification, carried out through ammonium sulfate precipitation (25-50% saturation) and gel-filtration chromatography, resulted in a 60.7-fold purification factor (40,593 U/mg protein), with 21.3% yield (32,150 U). The partially purified protease (PPP; 1,565 U/mL) showed optimal activity at 51-59 °C and pH 7.4-8.8. PPP is a serine protease depending on Ca^{2+} for maximal thermoactivity and thermostability. Thermal inactivation followed first-order kinetics. Higher thermostability with Ca^{2+} was thermodynamically depicted by increases in activation energy (E_a) and free energy (ΔG^\ddagger) for inactivation. Among different substrates, PPP preferentially hydrolyzed casein and PIS. Hydrolysis of PIS increases the evaluated bioactivities in comparison to non-hydrolyzed PIS. Hydrolysates demonstrated antioxidant capacity through the scavenging of synthetic radicals and Fe^{3+} -reducing ability. Additionally, hydrolysates were able to inhibit, *in vitro*, the activities of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) and angiotensin-converting enzyme (ACE), thus suggesting antidiabetic and antihypertensive potentials, respectively. PPP has proven to be useful for the production of multifunctional bioactive hydrolysates, with potential applications in the food industry.

Keywords: Enzyme. Biochemical characterization. Thermal inactivation. Hydrolysis. Bioactivity.

INTRODUÇÃO

As proteases constituem um grupo de enzimas hidrolíticas de destacada relevância biotecnológica. Particularmente, cerca de dois terços das enzimas proteolíticas disponíveis comercialmente derivam de microrganismos, fato relacionado aos elevados rendimentos enzimáticos alcançados através de cultivos realizados em espaço e tempo reduzidos. Ainda, a produção de enzimas microbianas não é afetada por condições sazonais ou por questões éticas, como ocorre na obtenção de proteases de origem animal e vegetal (GURUMALLESH et al., 2019; RAZZAQ et al., 2019). Considerando que microrganismos dependem de condições apropriadas para a produção de proteases, a utilização de substratos alternativos (como resíduos agroindustriais) representa estratégia conveniente visando diminuir os custos de obtenção destas enzimas (DAROIT; BRANDELLI, 2014).

Proteases microbianas são utilizadas em diversos produtos ou processos onde a hidrólise de ligações peptídicas é necessária. Indústrias de detergentes, couros e alimentos estão entre as principais consumidoras destas enzimas (BANERJEE; RAY, 2017; KAMAL et al., 2017). A extensa diversidade bioquímica e catalítica das proteases, resultado da enorme biodiversidade

microbiana, representa importante recurso a ser explorado na busca por enzimas adequadas para diferentes usos. Inúmeros microrganismos são investigados como produtores de proteases, contudo, bactérias do gênero *Bacillus* estão entre as principais fontes destas enzimas (CONTESINI et al., 2018). Além da prospecção de microrganismos proteolíticos, a caracterização da atividade e estabilidade de suas proteases torna-se fundamental na proposição de processos enzimáticos, definindo as condições ótimas e limites para a biocatálise (SILVA, 2017).

A produção de hidrolisados proteicos é uma área de crescente interesse, especialmente pela constatação de que a hidrólise enzimática pode resultar na liberação de peptídeos bioativos. Capacidades antioxidantes, antidiabéticas e anti-hipertensivas são reportadas para hidrolisados de diversas proteínas alimentares, incluindo aquelas do leite, ovos e carnes, indicando sua relevância na nutrição e saúde humanas (ALUKO, 2015; LACROIX; LI-CHAN, 2016; NWACHUKWU; ALUKO, 2019). Dentre as proteínas de origem vegetal, as proteínas da soja são abundantes e de baixo custo, amplamente utilizadas pela indústria de alimentos devido ao elevado valor nutricional e excelentes propriedades tecnológicas. A importância destas proteínas vem sendo expandida, visto que também representam promissoras fontes de hidrolisados e peptídeos bioativos (SINGH et al., 2014; CHATTERJEE et al., 2018).

Para além de enzimas proteolíticas comerciais, investigações acerca da produção de hidrolisados bioativos de proteínas de soja por proteases microbianas não comerciais são escassas (CASTRO; SATO, 2014; OLIVEIRA et al., 2015). Considerando que o substrato proteico, a protease utilizada e as condições de hidrólise têm efeitos diretos sobre potenciais bioatividades dos hidrolisados, a diversidade das proteases microbianas representa ferramenta extremamente útil no desenvolvimento e produção de novos hidrolisados proteicos (AGUILAR; SATO, 2018). Neste sentido, a bactéria queratinolítica *Bacillus* sp. CL18 possui capacidade de produzir proteases durante cultivos submersos em meio contendo penas de frango como principal substrato orgânico (SOBUCKI et al., 2017). Assim, a protease extracelular desta bactéria foi parcialmente purificada, caracterizada e utilizada na produção de hidrolisados de proteína isolada de soja (PIS), subsequentemente avaliados quanto as potenciais bioatividades.

MATERIAL E MÉTODOS

MICROORGANISMO E PRODUÇÃO DE PROTEASE

Bacillus sp. CL 18, previamente isolado de solo no município de Cerro Largo, RS (DE OLIVEIRA et al., 2017a) e caracterizado em relação ao seu potencial de degradação de penas de frango e produção de proteases (RIEGER et al., 2017; CALLEGARO et al., 2018), foi utilizado neste trabalho. Esta linhagem foi mantida a 4 °C em placas de Ágar Padrão para Contagem (PCA) e subcultivada periodicamente em placas de PCA (30 °C, 24 h) para manutenção e preparo de inóculos.

Suspensões de *Bacillus* sp. CL18, preparadas em solução salina estéril a partir da biomassa cultivada em placas de PCA (30 °C, 24 h) e ajustadas para 0,8 unidades de absorvância a 600 nm, foram usadas como inóculos para a produção de proteases em cultivos submersos.

O meio de cultura usado para a produção de proteases, denominado Caldo Pena (CP), foi previamente otimizado (SOBUCKI et al., 2017), sendo composto por K₂HPO₄ (0,3 g/L), KH₂PO₄ (0,4 g/L), NaCl (0,5 g/L), peptona (1,1 g/L), NH₄Cl (1,1 g/L) e penas de frango (30 g/L), com pH inicial ajustado para 7,5 previamente à esterilização em autoclave (121 °C, 105 kPa, 15 min). Erlenmeyers contendo 50 mL de CP foram inoculados com 1 mL de suspensão bacteriana e incubados a 30 °C em estufa com agitação orbital (125 rpm) por 5 dias. Os cultivos foram centrifugados (10.000 × g, 20 min) e os sobrenadantes usados como fonte de protease bruta para o processo de purificação parcial.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Neste trabalho, a atividade proteolítica foi verificada usando azocaseína como substrato enzimático. O meio reacional (500 µL) foi constituído por 100 µL de tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0), 300 µL de azocaseína (10 g/L, preparada no mesmo tampão) e 100 µL da enzima apropriadamente diluída. Após incubação a 55 °C por 15 min, as reações foram finalizadas pela adição de 600 µL de solução de ácido tricloroacético (100 g/L). Subsequentemente à centrifugação (10.000 × g, 5 min), 800 µL do sobrenadante foram misturados a

200 μL de NaOH (1,8 M) e a absorbância desta mistura mensurada a 420 nm em espectrofotômetro (DAROIT et al., 2009). Uma unidade (U) de atividade proteolítica foi definida arbitrariamente como a quantidade de enzima necessária para aumentar 0,01 unidade de absorbância nas condições do ensaio (CORRÊA et al., 2010).

Variações na temperatura de incubação, pH reacional e tempo de ensaio foram utilizadas na caracterização da protease parcialmente purificada, como poderá ser averiguado nas seções abaixo.

PURIFICAÇÃO PARCIAL DA PROTEASE

Os sobrenadantes contendo a protease foram submetidos à precipitação com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, realizada em banho de gelo, até 100% de saturação. Inicialmente, sulfato de amônio sólido foi adicionado para atingir 25% de saturação. Esta mistura foi centrifugada ($10.000 \times g$, 20 min, 4 °C), o sedimento foi reservado, e ao sobrenadante foi adicionado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido para atingir 50% de saturação. Este procedimento foi repetido novamente para atingir 75% e 100% de saturação. Os sedimentos das diferentes frações foram ressuspendidos em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0) e submetidos ao ensaio de atividade proteolítica. A maior atividade proteolítica foi observada na fração precipitada com 25-50% de saturação (resultados não mostrados). Este material foi então aplicado a uma coluna de filtração em gel (Sephadex G-100, 23,5 cm x 0,8 cm), equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0) com taxa de fluxo de 0,53 mL/min, sendo coletadas 40 frações de 1 mL cada. Cada fração foi avaliada quanto à atividade proteolítica e estimativa de proteínas a 280 nm. As frações com atividade proteolítica foram então reunidas, submetidas ao ensaio de protease e à determinação da concentração de proteínas através do método de Lowry et al (1951).

Amostras da protease bruta e da protease parcialmente purificada (PPP) foram submetidas a eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970), usando gel de empilhamento (4% de poliacrilamida) e gel de separação (12% de poliacrilamida). Após o preparo das amostras, aplicação aos géis e migração (150 V), os géis foram submetidos à coloração de proteínas por prata (BLUM et al., 1987). Um marcador de peso molecular

(BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen), constituído por 15 proteínas, entre 10 e 220 kDa, também foi aplicado aos géis.

As proteases bruta e a parcialmente purificada também foram submetidas à análise zimográfica, usando gel de empilhamento (4% de poliacrilamida) e gel de separação (12% de poliacrilamida). Ao gel de separação foi incorporada gelatina (1 mg/mL), para que esta proteína atuasse como substrato para as proteases no gel. As amostras foram preparadas em condições não desnaturantes, aplicadas aos géis e, após a migração, os géis foram lavados duas vezes (30 min por lavagem) com tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0, contendo 2,5% Triton X-100). Na sequência, os géis foram lavados três vezes com tampão sem Triton X-100 e, finalmente, os géis foram incubados (30 °C, 12 h) no mesmo tampão. Seguindo-se o tempo de incubação, os géis foram corados com solução de Coomassie Brilliant Blue R-250, onde zonas transparentes indicam a localização das proteases.

CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA PARCIALMENTE PURIFICADA

Temperatura e pH ótimos

O pH e temperatura ótimos da PPP foram determinados usando um delineamento composto central rotacional (CCDR) 2², onde a atividade proteolítica foi a variável dependente. Cinco níveis de temperatura (40 °C, 44,4 °C, 55 °C, 65,6 °C e 70 °C) e pH (6; 6,6; 8, 9,4 e 10) foram usados, totalizando 12 experimentos. Os resultados foram analisados usando *software* estatístico, sendo que coeficientes do modelo matemático foram obtidos através de análise de regressão, e a habilidade do modelo descrever a atividade proteolítica em função do pH e temperatura foram averiguados através do coeficiente de determinação (R²) e análise de variância.

Efeito de reagentes sobre a atividade proteolítica

Foram avaliados os efeitos da presença dos sais MnSO₄, CuSO₄, CoCl₂, FeSO₄, ZnCl₂ (1 e 5 mM), dos sais CaCl₂ e MgCl₂ (1, 5, 10 e 15 mM), dos detergentes não iônicos Triton X-100 e Tween 20 (0,5 e 1% v/v), do detergente

aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS; 0,05, 0,1, 0,2 e 0,5% v/v), do agente redutor β -mercaptoetanol (0,5 e 1% v/v), do solvente dimetil sulfóxido (DMSO; 0,5 e 1% v/v) e dos inibidores de protease, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) e 1,10-fenantrolina (1 e 5 mM) sobre a atividade proteolítica, em ensaios realizados nas condições ótimas de pH e temperatura da protease parcialmente purificada. A atividade enzimática sem a adição de reagentes foi considerada como sendo 100% e a atividade relativa (%) foi então calculada. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Estabilidade térmica da protease parcialmente purificada

A termoatividade da PPP foi avaliada em pH ótimo, na presença de substrato (azocaseína), com adição de Ca^{2+} (5 mM) ou Mg^{2+} (10 mM), em diferentes temperaturas (40-70 °C). Os ensaios foram realizados em triplicata. As atividades relativas (%) foram calculadas com base na atividade de PPP observada na temperatura ideal sem acréscimos (100%).

A estabilidade térmica da PPP foi avaliada através da sua pré-incubação, sem substrato, em diferentes temperaturas (50-70 °C) e por diferentes períodos (0-20 min), na ausência ou presença de Ca^{2+} (5 mM) ou Mg^{2+} (10 mM). Os ensaios foram realizados em triplicata. Após a pré-incubação, a atividade residual da protease (%) foi calculada com base na atividade da enzima sem pré-incubação (100%).

O modelo cinético de 1ª ordem (Eq. 1) foi usado para descrever os resultados de inativação obtidos:

$$\frac{A}{A_0} = \exp(-kt) \quad (1)$$

onde A/A_0 corresponde à atividade proteolítica residual no tempo t (min) e k (min^{-1}) é a taxa de inativação a uma dada temperatura.

O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da protease foi calculado segundo a Eq. (2):

$$t_{1/2} = \ln(2) / k \quad (2)$$

Parâmetros termodinâmicos também foram calculados. A relação entre os parâmetros temperatura e taxa de inativação, pode ser expressa algebricamente pela lei de Arrhenius (Eq. 3):

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT} \quad (3)$$

onde A é a constante de Arrhenius, E_a é a energia de ativação para o processo de inativação da protease, R é a constante universal dos gases [8,31 J/(mol·K)] e T é a temperatura absoluta (K). A E_a para o processo de inativação pode ser estimada através da regressão linear do logaritmo natural das taxas de inativação versus o recíproco da temperatura absoluta.

Com o valor obtido de E_a , a entalpia de ativação para o processo de inativação (ΔH) em cada temperatura foi calculada pela Eq. (4):

$$\Delta H = E_a - RT \quad (4)$$

A energia livre para inativação (ΔG) pode ser determinada de acordo com a seguinte expressão (Eq. 5):

$$\Delta G = -RT \ln\left(\frac{k \cdot h}{K_b T}\right) \quad (5)$$

onde h ($6,6262 \times 10^{-34}$ J/s) é a constante de Planck, K_b ($1,3806 \times 10^{-23}$ J/K) é a constante de Boltzmann e k (s^{-1}) é a constante da taxa de inativação de cada temperatura.

A partir das Eq. (4) e (5) é possível calcular a entropia de ativação para a inativação da protease (ΔS), como mostra a Eq. (6):

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (6)$$

Hidrólise de diferentes substratos

A capacidade da PPP em hidrolisar diferentes substratos foi avaliada nas condições ótimas de temperatura e pH. Albumina, PIS, caseína, penas de frango, farinha de penas, cabelos humanos, unhas de galinha e unhas de humanos foram testados como potenciais substratos. Cabelos humanos e penas de frango foram cortados em pequenos fragmentos (~0,5 cm), bem como as unhas de galinha e humanas (0,1 cm), antes da utilização nos ensaios.

Nestes experimentos, uma alíquota (100 µL) da PPP foi adicionada a uma suspensão do respectivo substrato (5 mg/mL) em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0) contendo CaCl₂ (5 mM). Esta mistura foi incubada a 55 °C por 1 h e 2 h. A reação foi finalizada com 500 µL de solução de TCA (10%, m/v) e, após centrifugação (10.000 × g, 15 min), os sobrenadantes foram coletados para mensuração da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados são apresentados como porcentagem em relação ao substrato que exibiu a maior absorbância a 280 nm (100%).

PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS DE PIS E AVALIAÇÃO DE BIOATIVIDADES

Hidrólise da PIS

Suspensões de PIS (10 g/L), preparadas em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0, 5 mM CaCl₂), foram adicionadas da PPP (2% ou 4%, v/v) e as hidrólises ocorreram a 55 °C, sob agitação, por 0-5 h. A reação foi finalizada através de fervura (100 °C, 15 min). Após o resfriamento e centrifugação (10.000 × g, 20 min), os sobrenadantes foram analisados quanto ao conteúdo de proteínas solúveis (LOWRY et al., 1951), e atividades antioxidantes, antidiabética e anti-hipertensiva *in vitro*.

Potencial antioxidante

Captura do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)

Esse método baseia-se na captura do radical catiônico ABTS, estimada através de ensaio de perda de coloração do radical a 734 nm (RE et al., 1999). Inicialmente, preparou-se a solução do radical ABTS através da reação de 5 mL de solução de ABTS (7 mM) com 88 µL de solução de K₂SO₄ (140 mM). Esta solução permaneceu no escuro, em temperatura ambiente, por aproximadamente 16 h antes do uso.

Para os ensaios, a solução do radical ABTS foi diluída em solução salina tamponada com fosfato (5 mM, pH 7,4) até atingir absorvância de 0,700 (± 0,02) unidades a 734 nm. Em seguida, adicionou-se 1 mL da solução diluída de ABTS às amostras dos hidrolisados de PIS (5 µL) e, após 6 min, a absorvância foi mensurada. Os controles foram realizados usando água destilada ao invés de amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como Porcentagem de captura, calculada conforme a Eq. (7):

$$\text{Porcentagem de captura (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100 \quad (7)$$

Captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

O radical DPPH pode ser inativado por moléculas antioxidantes, resultando na diminuição da absorvância a 517 nm (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Preparou-se uma solução metanólica de DPPH (60 µM) e, em ambiente escuro, amostras dos hidrolisados (1 mL) foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 3,9 mL da solução de DPPH. Após 1 h de incubação em temperatura ambiente, mensurou-se a captura do radical a 517 nm em espectrofotômetro. Os controles foram realizados usando água destilada ao invés de amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como Porcentagem de captura, calculada pela Eq. (7).

Poder redutor

Para esta determinação foi empregado método baseado na redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} (ZHU et al., 2006). Alíquotas do hidrolisado (1 mL) foram misturadas a 2,5 mL de tampão fosfato de sódio (200 mM, pH 6,6) e adicionadas a 2,5 mL de ferricianeto de potássio (10 g/L). Em seguida, a mistura reacional foi incubada em banho maria a 50 °C por 30 min. Após, 2,5 mL de TCA (100 g/L) foram adicionados à mistura e centrifugados (3.000 × g, 10 min). Adicionou-se então 2,5 mL do sobrenadante a 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de FeCl_3 (1 g/L) e, após 10 min, a absorbância foi mensurada a 700 nm. Para o controle foi usado 1 mL de água destilada. Os ensaios foram realizados em triplicata. Apresentam-se os resultados como absorbância a 700 nm (Abs700).

Atividade quelante de ferro

A atividade quelante de Fe^{2+} foi mensurada utilizando como base o método descrito por Chang et al. (2007). Amostras dos hidrolisados de PIS (1 mL) foram misturadas a 3,7 mL de água destilada, 0,1 mL de FeSO_4 (2 mM) e 0,2 mL de ferrozina [3-(2-piridil)-5,6-bis-(4-ácido fenil sulfônico)-1,2,4-triazina; 5 mM]. Após 10 min, a absorbância foi mensurada a 562 nm. Para o controle utilizou-se água destilada ao invés de amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como Atividade quelante (%), calculada pela Eq. (8):

$$\text{Atividade quelante (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100 \quad (8)$$

Potencial anti-hipertensivo

O potencial anti-hipertensivo dos hidrolisados de PIS foi avaliado, *in vitro*, através da inibição da enzima conversora de angiotensina (ACE), conforme proposto por Cushman e Cheung (1971), com modificações. Alíquotas dos hidrolisados (20 µL) foram misturadas a 100 µL de solução

tamponada contendo o substrato hipuril-histidil-leucina (8 mM; em tampão HEPES-HCl (50 mM) contendo 300 mM NaCl, pH 8,3, 37 °C). Após a adição de 40 µL da ACE (0,1 U/mL), a mistura foi incubada a 37 °C por 30 min e a então reação finalizada pela adição de 150 µL de solução de HCl (1 M). Em seguida, o ácido hipúrico liberado pela ação da ACE foi extraído com 1 mL de acetato de etila e a fase orgânica transferida para frasco de vidro para evaporação. O material residual do frasco foi dissolvido com 800 µL de água destilada e a absorbância da mistura resultante foi mensurada a 228 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. A atividade inibitória foi calculada pela Eq. (9):

$$\text{Inibição (\%)} = \left\{ 1 - \left[\frac{(A - B)}{(C - D)} \right] \right\} \times 100 \quad (9)$$

onde A é a absorbância na presença da enzima, substrato e hidrolisado, B é a absorbância na presença de substrato e hidrolisado, sem enzima (substituída por tampão), C é a absorbância na presença de enzima e substrato, sem hidrolisado (substituído por água destilada), e D é a absorbância com substrato, mas sem enzima (substituída por tampão) e hidrolisado (substituído por água destilada).

Potencial antidiabético

O potencial antidiabético dos hidrolisados de PIS foi investigado através da inibição da atividade da enzima dipeptidil peptidase IV (DPP IV), *in vitro* (LACROIX; LI-CHAN, 2013). Amostras dos hidrolisados (25 µL) foram adicionadas a 25 µL do substrato Gli-Pro *p*-nitroanilida (2 mM) preparado em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,6), e esta mistura foi incubada a 37 °C por 10 min. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de DPP IV (0,01 U/mL), realizada a 37°C, por 60 min, e após finalizada através da adição de 100 µL de tampão acetato de sódio (1 M, pH 4,0). A absorbância da solução resultante mensurada a 405 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. A atividade inibitória dos hidrolisados de PIS frente à ação da DDP IV foi calculada pela Eq. (9).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PURIFICAÇÃO PARCIAL DA PROTEASE

A protease produzida por *Bacillus* sp. CL 18 no CP foi purificada dos sobrenadantes da cultura (668,8 U/mg proteína) por precipitação com sulfato de amônio e cromatografia líquida de gel filtração. Através da precipitação fracionada com sulfato de amônio (25-50% de saturação) foi possível recuperar 47% da atividade detectada nos sobrenadantes de cultivo, resultando em um aumento da atividade específica (Tabela 1).

A fração de 25% a 50% de precipitação com sulfato de amônio foi aplicada em uma coluna de gel filtração Sephadex G-100. A Figura 1 apresenta um perfil de eluição típico, onde foram observados dois picos de atividade azocaseinolítica (frações 8-10 e 13), e dois picos de proteína (frações 5-7 e 12-14). As frações com maior atividade enzimática (8-10) foram reunidas e utilizadas posteriormente como PPP. Avaliações da atividade proteolítica e de proteínas solúveis indicaram atividade específica de 40593,3 U/mg proteína, representando fator de purificação de 60,7 vezes, com rendimento de 21,3% (Tabela 1).

Tabela 1 - Sumário da purificação parcial da protease de *Bacillus* sp. CL18.

Etapa de purificação	Atividade total (U)	Atividade (U/mL)	Proteína solúvel (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Enzima bruta	151060,0	4648,0	6,95	668,8	1,0	100,0
Precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄	71007,0	32130,0	3,19	10072,1	15,1	47,0
Gel filtração	32149,9	2435,6	0,06	40593,3	60,7	21,3

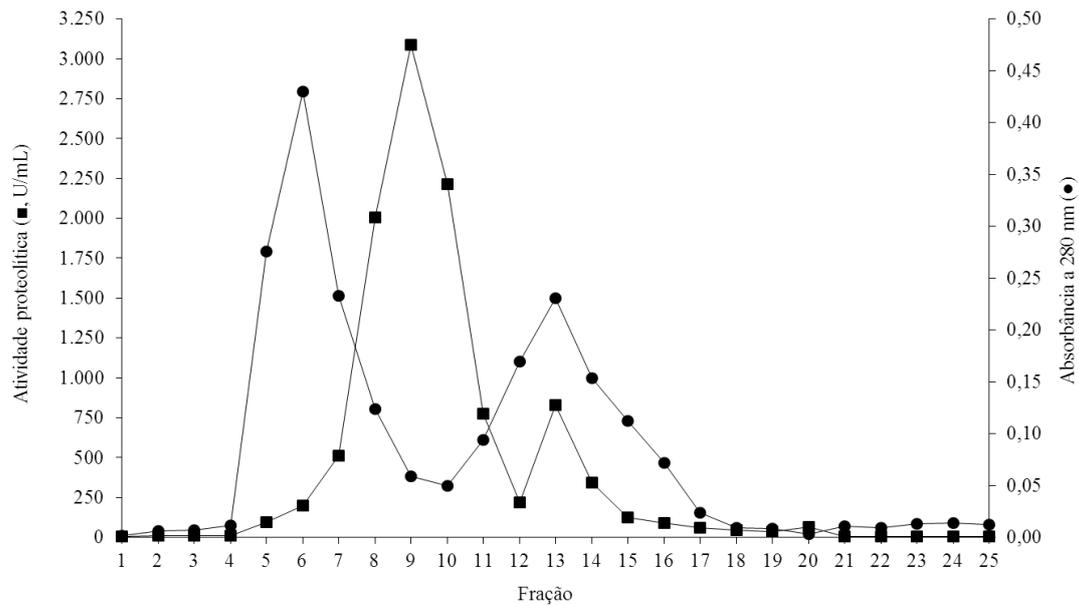


Figura 1 - Perfil de eluição de sobrenadantes de *Bacillus* sp. CL18 concentrados com sulfato de amônio (saturação de 25-50%) aplicados à coluna de gel-filtração Sephadex G-100. Atividade proteolítica (■; U/mL), proteínas solúveis (●; mg/mL).

A análise eletroforética em condições desnaturantes (SDS-PAGE) indicou que a purificação não foi completa, já que diversas bandas de proteína foram detectadas nas análises realizadas com o *pool* de frações oriundas da gel-filtração. No entanto, em relação à protease bruta, observou-se o desaparecimento de diversas bandas, enquanto outras tornaram-se mais evidentes, como aquelas a ~30 e ~20 kDa (Figura 2a).

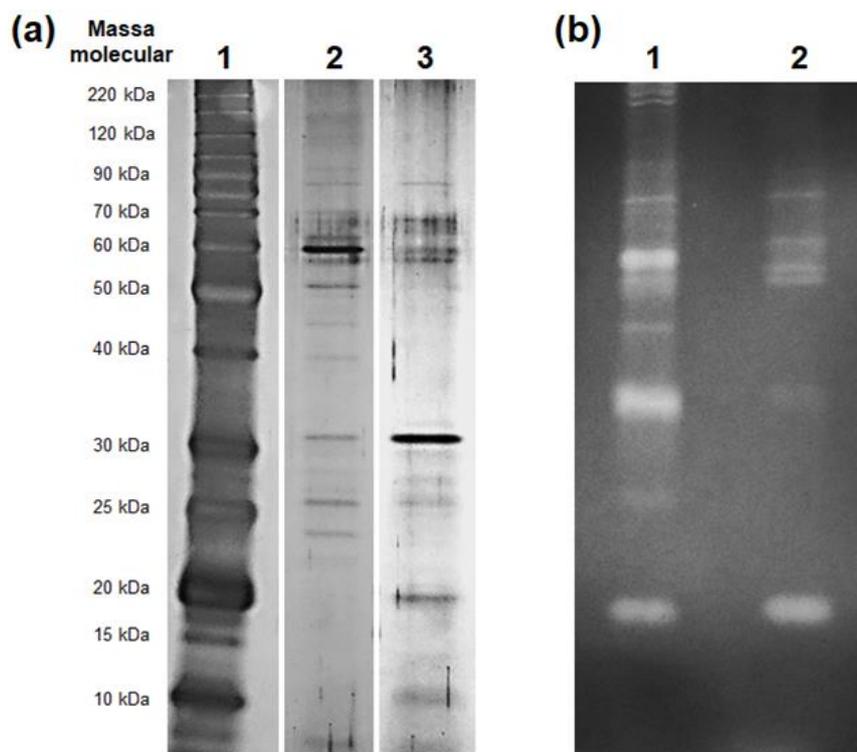


Figura 2 - Análises eletroforéticas das proteases bruta e parcialmente purificada. (a) SDS-PAGE: Linha 1, marcador de massa molecular; Linha 2: protease bruta; Linha 3: protease parcialmente purificada. (b) Zimograma: Linha 1: protease bruta; Linha 2: protease parcialmente purificada.

Os zimogramas indicaram a produção de diferentes proteases extracelulares por *Bacillus* sp. CL18 (Figura 2b), como também observado para outros *Bacillus* (FERRAREZE et al., 2016; HAMMAMI et al., 2017; SAGGU; MISHRA, 2017). Diversas bandas com atividade proteolítica foram eliminadas pela purificação parcial e, dentre as proteases remanescentes, uma banda majoritária foi observada (Figura 2b). A massa molecular desta banda majoritária não pode ser aferida com exatidão, visto que enzimas proteolíticas costumam apresentar migração anômala em zimogramas, quando comparada à migração em SDS-PAGE (HUMMEL et al., 1996).

De acordo com a proposta de utilização de enzimas, pode haver uma variação no nível exigido de purificação das mesmas. Geralmente, enzimas completamente purificadas não são empregadas em aplicações industriais, como na indústria de detergentes e de alimentos (CORRÊA et al., 2010).

CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA PARCIALMENTE PURIFICADA

Temperatura e pH ótimos

A investigação dos efeitos da temperatura e pH sobre a atividade proteolítica é essencial para determinar os limites de processos biocatalíticos. A temperatura e o pH ótimos para a atividade da PPP foram investigados através de um experimento CCDR 2² (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeitos da temperatura e pH, avaliados através de delineamento composto central rotacional (CCDR 2²), sobre a atividade da protease parcialmente purificada de *Bacillus* sp. CL18.

Experimento	Temperatura		pH		Atividade proteolítica (U/mL)
	Real (°C)	Codificado	Real	Codificado	
1	65,6	1	9,4	1	749,51
2	65,5	1	6,6	-1	898,77
3	44,4	-1	6,6	-1	635,17
4	44,4	-1	9,4	1	690,75
5	70,0	1,41	8,0	0	840,02
6	40,0	-1,41	8,0	0	752,68
7	55,0	0	10,0	1,41	2002,39
8	55,0	0	6,0	-1,41	1422,79
9	55,0	0	8,0	0	2267,58
10	55,0	0	8,0	0	2331,10
11	55,0	0	8,0	0	2299,34
12	55,0	0	8,0	0	2280,28

Embora a atividade proteolítica tenha sido observada em todas as condições experimentais, as atividades máximas foram identificadas no ponto central do experimento (55 °C; pH 8,0) (Tabela 2). Em pH 8,0 (ponto central), as temperaturas axiais afetaram negativamente a atividade da protease; da mesma forma, quedas na atividade proteolítica ocorreram a 55 °C (ponto central) quando avaliada nos pHs máximo e mínimo (Tabela 2).

A análise estatística dos resultados obtidos mostrou que, na faixa estudada, todas as variáveis foram significativas sobre a atividade no nível de confiança de 95% (Tabela 3). O pH teve efeito mais pronunciado na faixa linear das variáveis independentes quando comparado a temperatura. Particularmente, os efeitos lineares da temperatura e do pH (de -1 a +1) foram positivos; no entanto, os efeitos quadráticos foram altamente negativos indicando a redução da atividade enzimática quando da aproximação dos valores axiais de temperatura e pH. O efeito negativo da interação entre temperatura e pH (Tabela 3) indica que a diminuição simultânea nos níveis de ambas as variáveis independentes resultou em leve melhoria na atividade da protease (VIANA et al., 2010).

Tabela 3 - Efeito das variáveis independentes (temperatura e pH) e sua interação sobre a atividade da protease parcialmente purificada.

Variáveis	Efeito (U/mL)	Erro Padrão	Valor <i>p</i>
Média	2296,08	13,82	0,000
[1] Temperatura (Linear)	111,71	19,56	0,010
Temperatura (Quadrático)	-1762,55	21,93	0,000
[2] pH (Linear)	181,43	19,56	0,002
pH (Quadrático)	-840,82	21,93	0,000
[1] × [2]	-102,42	27,62	0,034

A análise de regressão dos dados obtidos foi realizada e o modelo descrito pela Eq. (10) foi gerado:

$$P = 2296,079 + 55,853 \times T - 881,276 \times T^2 + 90,713 \times pH - 420,412 \times pH^2 - 51,211 \times T \times pH \quad (10)$$

Onde *P* é a atividade proteolítica (U/mL), *T* e *pH* são os valores codificados para temperatura e pH, respectivamente (Tabela 2). A significância do modelo gerado foi analisada pela ANOVA através do teste *F* de Fischer (Tabela 4). O valor *F* calculado foi de 11,94, que é 2,72 vezes maior que o *F* tabelado ($F_{0,95(5;6)} = 4,39$), o que demonstra a capacidade do modelo matemático na predição da atividade proteolítica dentro dos valores de

temperatura e pH investigados ($p < 0,05$). O coeficiente de determinação R^2 foi de 0,90, indicando que 90% da variabilidade pode ser explicada pelo modelo.

Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Valor F
Regressão	6152058	5	1230411,6	11,9436
Residual	618111	6	103018,5	
Total	6770169	11		

SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MQ: Média dos quadrados.

Com base no modelo, foi gerado o gráfico de superfície de resposta, que demonstrou que atividades ótimas podem ser alcançadas na faixa de 51-59 °C e pH 7,4-8,8 (Figura 3). Especificamente, foram selecionadas as condições de 55 °C e pH 8,0 para as caracterizações subsequentes.

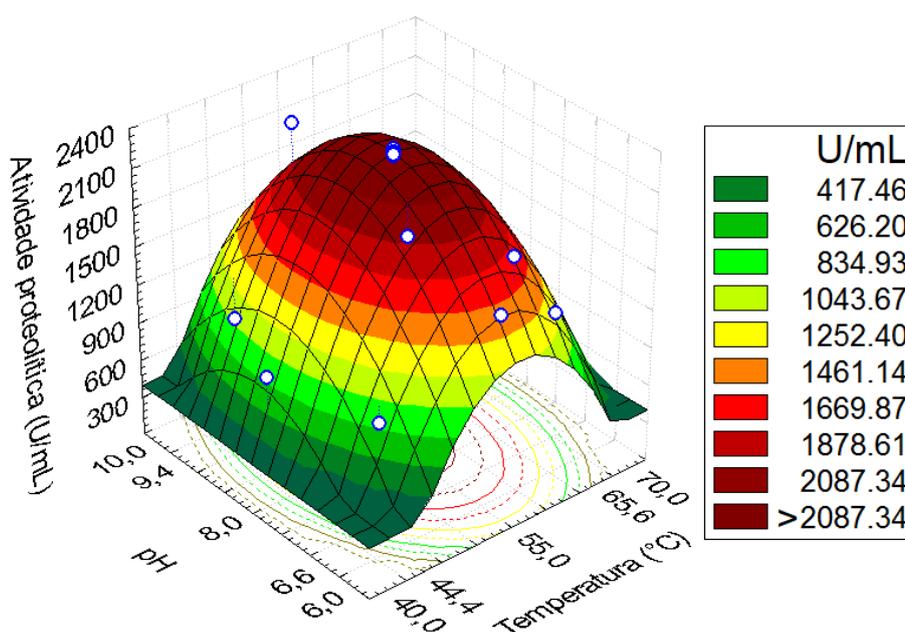


Figura 3 - Superfície de resposta para os efeitos da temperatura e do pH sobre a atividade da protease parcialmente purificada.

De forma análoga à PPP de *Bacillus* sp. CL18, a PPP de *Bacillus amyloliquefaciens* 6B demonstrou atividade ótima a 50 °C e pH 8,0 (BOSE et al., 2014a) e uma PPP de *Brevibacillus brevis* BT 2 exibiu maior atividade a 50 °C e pH 9,0 (MISHRA, 2016). Uma protease de *Bacillus caseinilyticus* exibiu

atividade na ampla faixa de pH de 6 a 10, com a atividade máxima em pH 8,0 e temperatura ótima a 60 °C (MOTHE; SULTANPURAM, 2016).

Comparativamente, uma protease de *Bacillus subtilis* DR8806 apresentou atividade máxima em pH 8,0 e 45 °C, embora também tenha apresentado atividade considerável (65%) em temperaturas mais altas (70°C) (FARHADIAN et al., 2015). *Bacillus subtilis* VSG-4 produziu uma protease que apresentou atividade máxima em pH 9,0 e 50 °C, e a atividade da enzima diminuiu gradualmente após 50 °C (GIRI et al., 2011). É possível indicar que as condições de temperatura e pH para a atividade ótima da PPP de *Bacillus* sp. CL18 são comparáveis àquelas comumente reportadas para proteases de *Bacillus* spp. (CONTESINI et al., 2018).

Efeito de reagentes sobre a atividade proteolítica

Sais, solventes, detergentes, entre outros, podem afetar a atividade enzimática e assim, potenciais aplicações (CHATTERJEE et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2017b). A atividade da PPP na presença de diversos reagentes foi investigada nas condições ótimas (55 °C; pH 8,0). Os efeitos de sais sobre a atividade proteolítica são apresentados na Tabela 5.

A atividade proteolítica foi levemente estimulada (~7%) por CaCl₂ (1 e 5 mM), não afetada por MgCl₂, mas significativamente inibida por ZnCl₂, FeSO₄, MnSO₄, CuSO₄ e CoCl₂ (Tabela 5). Efeitos análogos foram reportados para proteases de *B. alcalophilus* TCCC11004 (CHENG et al., 2010) e *B. pumilus* A1 (FAKHFAKH-ZOUARI et al., 2010). A PPP de *B. cereus* apresentou aumento da atividade enzimática ao adicionar Ca²⁺, enquanto a atividade foi diminuída com os íons metálicos Fe³⁺ e Zn²⁺ (KOTLAR et al., 2015).

Bhange et al. (2016) reportaram que uma PPP de *B. subtilis* PF1 foi estimulada por Ca²⁺ e Mg²⁺ (2 mM) mas inibida por Zn²⁺, Co²⁺ e Cu²⁺. Os íons Ca²⁺ e Mg²⁺ também estimularam, mas o íon Cu²⁺ inibiu a PPP de *Citricoccus* sp. Bact2 (VERMA; PANDEY, 2019). Além dos efeitos positivos de Ca²⁺ e Mg²⁺ (5 mM), a protease de *B. subtilis* GA CAS8 foi inibida por Zn²⁺ e Fe²⁺ (SATHISHKUMAR et al., 2015). À vista disso, o efeito de íons metálicos e outros reagentes, em geral, pode oscilar dependendo da protease que está

sendo investigada. Portanto, é importante realizar a caracterização para identificar possíveis aplicações enzimáticas.

Tabela 5 - Influência de vários sais, em diferentes concentrações, sobre a atividade da protease parcialmente purificada de *Bacillus* sp. CL18.

Sal	Concentração (mM)	Atividade relativa (%) ^a
Controle	--	100,0 ± 2,7
CaCl ₂	1	107,0 ± 1,0*
	5	107,7 ± 2,5*
	10	98,7 ± 0,6
MgCl ₂	1	101,8 ± 2,3
	5	100,4 ± 3,3
	10	106,4 ± 5,5
MnSO ₄	1	92,9 ± 1,0*
	5	77,1 ± 0,4*
CuSO ₄	1	70,0 ± 4,7*
	5	48,1 ± 3,0*
CoCl ₂	1	48,3 ± 0,9*
	5	43,5 ± 0,1*
FeSO ₄	1	81,2 ± 2,1*
	5	19,4 ± 2,5*
ZnCl ₂	1	48,5 ± 2,2*
	5	13,3 ± 0,7*

^a O asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

A estimulação da atividade proteolítica causada por íons metálicos, principalmente Ca²⁺ e Mg²⁺, pode ser devida à formação de ligações e/ou pontes iônicas que estabilizam a enzima em sua conformação ativa, bem como pela maior estabilidade de complexos enzima-substrato; além disso, íons metálicos podem proteger a enzima contra a desnaturação térmica (BRANDELLI et al., 2010; SHARMA et al., 2019). Já a inibição da atividade por íons metálicos pode estar associada à sua interação com grupos carregados nas cadeias laterais de aminoácidos acessíveis, influenciando negativamente a conformação e a estabilidade da enzima (BOSE et al., 2014b).

Quanto aos efeitos de outros reagentes, o detergente não-iônico Tween 20 e solvente orgânico DMSO não afetaram a atividade proteolítica nas concentrações testadas (Tabela 6). Entretanto, o detergente não-iônico Triton X-100, o detergente aniônico SDS e o agente redutor β -mercaptoetanol inibiram moderadamente esta protease (Tabela 6).

Tabela 6 - Influência de vários reagentes, em diferentes concentrações, na atividade da protease parcialmente purificada de *Bacillus* sp. CL18.

Reagente	Concentração	Atividade relativa (%) ^a
Controle	--	100 ± 2,9
Triton X-100	0,50 (v/v)	84,0 ± 1,2*
	1,00 (v/v)	75,1 ± 1,3*
Tween 20	0,50 (v/v)	93,9 ± 5,4
	1,00 (v/v)	101,5 ± 3,2
β -mercaptoetanol	0,50 (v/v)	67,3 ± 3,4*
	1,00 (v/v)	66,4 ± 0,1*
Dimetil sulfóxido (DMSO)	0,50 (v/v)	97,0 ± 4,2
	1,00 (v/v)	99,2 ± 3,0
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	0,05 (m/v)	86,2 ± 0,4*
	0,10 (m/v)	77,3 ± 4,6*
	0,20 (m/v)	63,5 ± 5,0*
	0,50 (m/v)	41,7 ± 1,7*

^a O asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Em contrapartida, o SDS estimulou a atividade enzimática da protease de *Bacillus subtilis* FTC02PR1, enquanto os detergentes não iônicos Tween-20 e Triton X-100 não apresentaram efeito significativo em comparação com o controle e, o agente β -mercaptoetanol foi responsável pela redução da atividade (FERRAREZE et al., 2016).

Já a protease de *B. caseinolyticus* teve sua atividade reduzida por Tween 20 e SDS (0,5 e 1,0%, v/v) (MOTHE; SULTANPURAM, 2016), enquanto uma protease de *B. subtilis* DR8806 foi inibida por Triton X-100 e SDS (FARHADIAN et al., 2015). Os detergentes Triton X-100 e Tween 20 (0,5%, v/v) não afetaram a atividade da PPP de *Staphylococcus sciuri*. Para esta protease, a presença

de 0,1% SDS estimulou a atividade enzimática, mas concentrações superiores (0,2 e 0,5%, m/v) causaram diminuição (ABU-KHUDIR et al., 2019).

A elevação da atividade enzimática por detergentes pode derivar da otimização da solubilidade do substrato e do incremento da acessibilidade da enzima ao substrato; já efeitos negativos estão potencialmente associados à desestabilização da forma nativa da enzima (DAROIT et al., 2010). O SDS, particularmente, é um reconhecido agente desnaturante de proteínas (VENUGOPAL; SARAMMA, 2006).

Embora algumas proteases não são inibidas por β -mercaptoetanol (ANBU, 2013; RAMKUMAR et al., 2018), a inibição moderada na atividade indica que ligações dissulfeto (S-S) são importantes para a estrutura tridimensional das enzimas, embora resíduos de cisteína possivelmente não sejam essenciais para a catálise (FERRAREZE et al., 2016).

A PPP não foi afetada pelo inibidor de metaloproteases dependentes de Zn^{2+} , 1,10-fenantrolina. Porém, a enzima foi inativada pelo PMSF, que é um inibidor de serino proteases, enquanto o agente quelante EDTA inibiu moderadamente a protease (Tabela 7).

Tabela 7 - Influência de inibidores, em diferentes concentrações, sobre a atividade da protease parcialmente purificada de *Bacillus* sp. CL18.

Inibidor	Concentração (mM)	Atividade residual (%) ^a
Controle	--	100,0 \pm 3,4
Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)	1	37,0 \pm 2,5*
	5	37,2 \pm 1,4*
Fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF)	1	2,2 \pm 0,5*
	5	0,3 \pm 0,2*
1,10-fenantrolina	1	97,9 \pm 2,8
	5	104,1 \pm 5,9

^a O asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

A atividade de uma protease de *Streptomyces* sp., apresentou um aumento substancial na presença de Ca^{2+} , além disso, foi inibida por PMSF e EDTA (TATINENI et al., 2008). Perfil de inibição similar foi demonstrado para uma protease de *Vibrio fluvialis*, sugerindo ser uma serino protease

(VENUGOPAL; SARAMMA, 2006). A inibição de serino proteases por EDTA se deve à quelação de íons metálicos, particularmente Ca^{2+} , responsáveis pela estabilização enzimática (GUPTA; RAMNANI, 2006).

A inibição por EDTA e PMSF (Tabela 7) e a estimulação por CaCl_2 (Tabela 5) indicam que a PPP possui características de serino protease dependente de cátions divalentes, possivelmente Ca^{2+} , para atividade e/ou estabilidade (FERRAREZE et al., 2016). De fato, a maior parte das proteases de *Bacillus* são classificadas nesta categoria (CONTESINI et al., 2018).

Atividade e estabilidade térmica da protease parcialmente purificada: efeitos de Ca^{2+} e Mg^{2+}

Considerando a atividade mais elevada na presença de Ca^{2+} (5 mM) e a tendência de incremento da atividade por Mg^{2+} (10 mM) na temperatura ótima (55 °C; Tabela 5), a atividade da PPP foi investigada na presença destes íons metálicos em diferentes temperaturas (Figura 4).

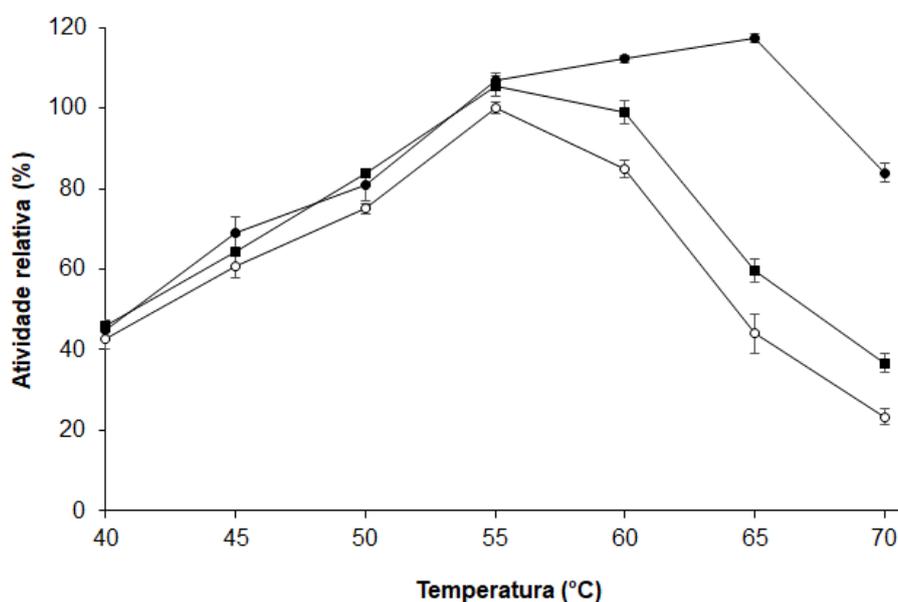


Figura 4 - Atividade da PPP em função de diferentes temperaturas, na ausência de íons metálicos (○) e na presença de Ca^{2+} (5 mM; ●) ou Mg^{2+} (10 mM; ■).

Em temperaturas de 40 a 55 °C, o efeito dos íons metálicos não foi aparente. Contudo, em temperaturas acima de 55 °C, a presença de Ca^{2+} ou Mg^{2+} causou aumentos significativos ($p < 0,05$) na atividade enzimática em relação àquela observada na sua ausência. Particularmente, a atividade máxima com Ca^{2+} foi observada a 65 °C, enquanto permaneceu em 55 °C na ausência de íons ou presença de Mg^{2+} (Figura 4). Resultados similares são reportados para outras proteases microbianas, reforçando a efetividade do Ca^{2+} sobre a termoatividade da PPP de *Bacillus* sp. CL18, possivelmente pela maior estabilidade conformacional da enzima em temperaturas mais elevadas (HADJIDJ et al., 2018; GOHEL; SINGH, 2018).

A estabilidade térmica da enzima foi então avaliada através da pré-incubação da enzima (na ausência de substrato) em diversas temperaturas, na ausência ou presença de CaCl_2 (5 mM) e MgCl_2 (10 mM), e então a atividade enzimática residual foi mensurada nas condições ótimas (55 °C; pH 8,0). Nos ensaios utilizando tampão sem adições e tampão contendo Mg^{2+} , a estabilidade foi avaliada a 50-60 °C; contudo, na presença de Ca^{2+} a inativação foi avaliada a 60-70 °C, visto que a PPP não demonstrou perda da atividade quando incubada por 20 min a 50-57,5 °C (resultados não mostrados).

As atividades residuais, ajustadas ao modelo de primeira ordem através de regressão não linear, indicaram a adequação deste modelo para a descrição da cinética de inativação térmica da PPP (Figura 5), devido aos baixos valores de erro padrão (0,003-0,051) e Qui-quadrado (0,00005-0,003), com coeficientes de determinação (R^2) que variaram de 0,972 a 0,997.

Sem a adição de íons metálicos, a PPP manteve 44, 27 e 11% da atividade após 20 min a 50, 52,5 e 55 °C, respectivamente. Contudo, ~8% da atividade foram mantidas após 12 e 6 min a 57,5 e 60 °C (Figura 5a). Nestas condições, o $t_{1/2}$ da PPP foi de 15,9 min a 50 °C e de 7 min a 60 °C (Tabela 8), indicando maior estabilidade em comparação à PPP de *Chryseobacterium* sp. kr6, que apresentou $t_{1/2}$ de 13 e 4,2 min a 50 e 55 °C, respectivamente (SILVEIRA et al., 2010) e à protease de *Bacillus* sp. P45, completamente inativada após 10 min de pré-incubação a 50 °C (DAROIT et al., 2010).

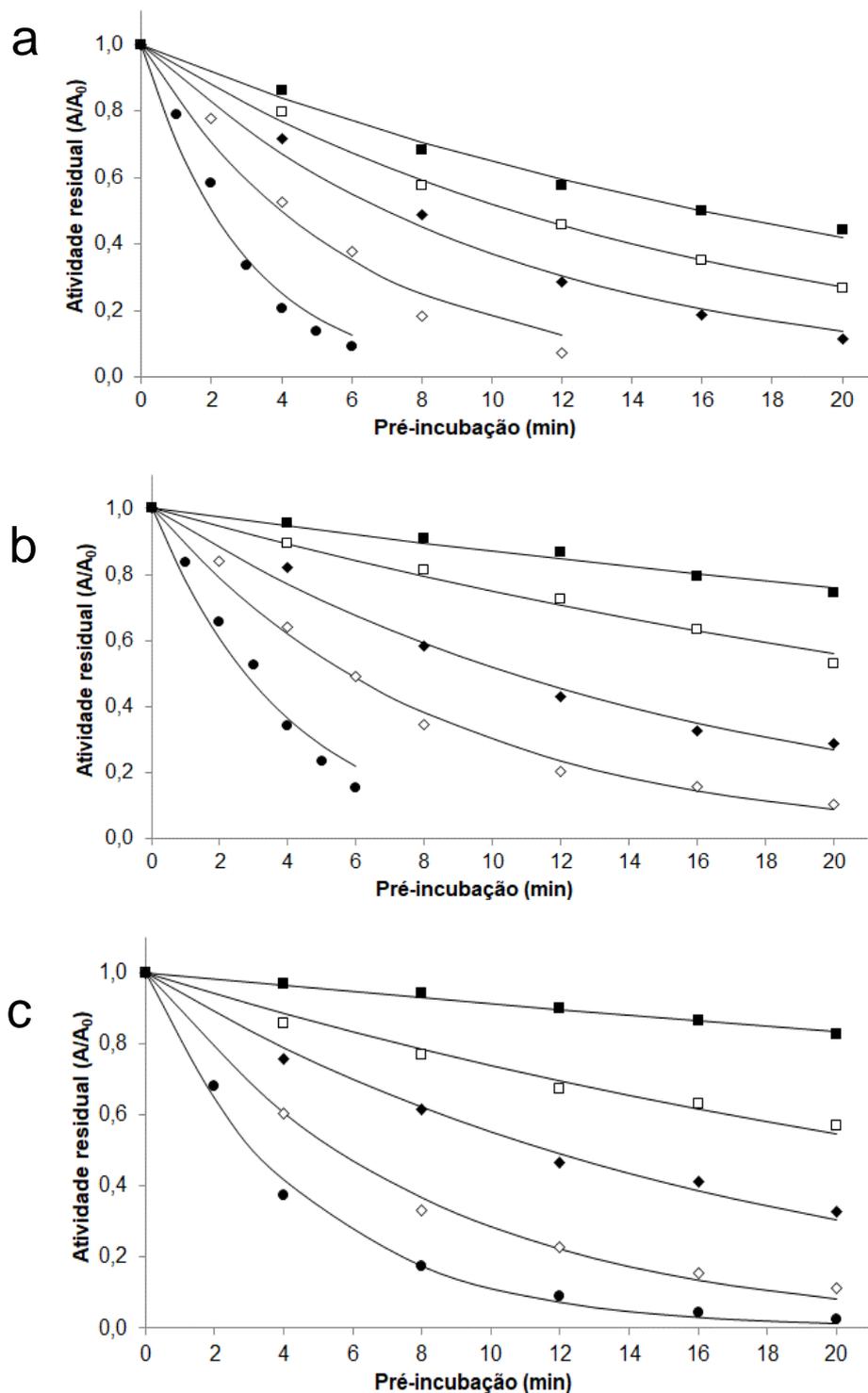


Figura 5 - Inativação térmica da PPP em função da temperatura e tempo de pré-incubação, ajustada ao modelo de primeira ordem. (a) Em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8), sem a adição de íons, a 50 (■), 52,5 (□), 55 (◆), 57,5 (◇) e 60 °C (●). (b) Em tampão com 10 mM Mg^{2+} , a 50 (■), 52,5 (□), 55 (◆), 57,5 (◇) e 60 °C (●). (c) Em tampão com 5 mM Ca^{2+} , a 60 (■), 62,5 (□), 65 (◆), 67,5 (◇) e 70 °C (●).

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos da inativação térmica da PPP.

T (°C)	Sem adição		Mg ²⁺ (10 mM)		T (°C)	Ca ²⁺ (5 mM)	
	k (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)	k (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)		k (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)
50,0	0,04342	15,96	0,01372	50,52	60,0	0,00909	76,17
52,5	0,06545	10,59	0,02899	23,91	62,5	0,03026	22,90
55,0	0,09904	6,99	0,06598	10,50	65,0	0,05913	11,72
57,5	0,17376	3,99	0,12028	5,76	67,5	0,12546	5,52
60,0	0,34272	2,02	0,25219	2,75	70,0	0,21852	3,17

De forma similar à PPP de *Bacillus* sp. CL18, uma protease de *B. subtilis* FTC02PR1 exibiu cerca de 20% da atividade inicial após 15 min de pré-incubação a 55 °C (FERRAREZE et al., 2016). Contudo, uma protease de *B. amyloliquefaciens* 6B exibiu t_{1/2} de 44 e 19 min a 50 e 60 °C, respectivamente (BOSE et al., 2014a). As proteases de *B. koreensis* (BK-P21A) e *B. subtilis* GACAS8 demonstraram completa estabilidade a 60 °C (ANBU, 2013; SATHISHKUMAR et al., 2015).

Portanto, a PPP de *Bacillus* sp. CL18 exibiu baixa termoestabilidade sem a adição de íons metálicos ao meio reacional. A adição de Mg²⁺ (10 mM) resultou em incremento da estabilidade térmica avaliada a 50-60 °C (Figura 5b). Especificamente, 74, 53 e 29% da atividade mensurada no início dos experimentos (tempo zero) foram demonstradas pela PPP após 20 min de pré-incubação a 50, 52,5 e 55 °C, respectivamente. Quando avaliada a 57,5 e 60 °C, atividades residuais de ~15% foram observadas após 16 e 6 min, respectivamente (Figura 5b). A PPP, nestas condições, apresentou t_{1/2} de 50,5 min a 50 °C e de 2,7 min a 60 °C (Tabela 8).

Na presença de Ca²⁺ (5 mM), os experimentos de estabilidade térmica foram realizados a 60-70 °C. A atividade remanescente da PPP, após 20 min de pré-incubação a 60, 62,5 e 65 °C foi de 82, 57 e 33%, respectivamente, enquanto que nas temperaturas de 67,5 e 70 °C, a atividade residual foi de 11 e 2% após 20 min (Figura 5c). A análise dos dados indicou t_{1/2} entre 76,1 min (60 °C) e 3,1 min (70 °C) (Tabela 8). O íon Ca²⁺ também apresentou efeito positivo sobre a estabilidade térmica de outras serino proteases de *Bacillus* spp. (HADDAR et al., 2009; CHENG et al., 2010; HADJIDJ et al., 2018), assim

como o íon Ca^{2+} (e Mg^{2+} em menor escala) sobre a estabilidade de uma PPP de *Chryseobacterium* sp. kr6 (SILVEIRA et al., 2010).

Em todos os casos, como esperado, as constantes de inativação (k) aumentaram e os $t_{1/2}$ diminuíram com o aumento da temperatura (Tabela 8), indicando uma inativação mais rápida em temperaturas mais altas (DE OLIVEIRA et al., 2017b; GOHEL; SINGH, 2018). Como as temperaturas empregadas nos ensaios de inativação com CaCl_2 foram mais elevadas, é evidente que a protease alcançou maior estabilidade quando comparada à observada com MgCl_2 ou sem íons metálicos.

Parâmetros termodinâmicos são essenciais no entendimento da estabilidade e do provável mecanismo de desnaturação e, com isso, das condições de aplicação da PPP. Os valores de k foram utilizados para construir gráficos de Arrhenius, ou seja, usando $\ln(k)$ versus o inverso da temperatura absoluta ($1/T$). Nas retas obtidas, o coeficiente angular equivale a $-E_a/R$ e o coeficiente linear equivale à constante de Arrhenius (A). O R^2 das retas variou de 0,982 (com Ca^{2+}) a 0,998 (com Mg^{2+}) (resultados não mostrados), permitindo o cálculo da E_a para os processos de inativação térmica.

Para as avaliações realizadas nas mesmas temperaturas (ausência de íons e presença de Mg^{2+}) foi possível observar aumento do valor da E_a com Mg^{2+} . Ainda, mesmo com a necessidade de realizar os experimentos de estabilidade térmica com Ca^{2+} em temperaturas mais elevadas, a E_a foi superior àquelas dos experimentos com Mg^{2+} e sem a adição de íons (Tabela 9). Considerando a E_a como a energia necessária para a inativação térmica (KLEIN et al., 2018), valores mais elevados indicam a contribuição, particularmente de Ca^{2+} , para a maior estabilidade térmica da PPP.

Os parâmetros termodinâmicos ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger e ΔS^\ddagger para o processo de inativação térmica da PPP foram então calculados [Eq. (4-6)] e estão apresentados na Tabela 9. A ΔS^\ddagger indica a desordem no sistema reacional, sendo que valores positivos (Tabela 9) sugerem que a desorganização da estrutura terciária das enzimas foi a etapa limitante da inativação térmica (GOUZI et al., 2012; KLEIN et al., 2018).

A inativação cinética de enzimas usualmente resulta da quebra de ligações não covalentes (AGUILAR et al., 2019). Neste sentido, a ΔH^\ddagger estima o número de ligações não covalentes quebradas durante a inativação, sendo que

valores positivos (Tabela 9) indicam o caráter endergônico do processo (DAROIT et al., 2011). Os valores de ΔH^\ddagger foram superiores na presença de íons (Tabela 9), indicando maior demanda energética para a inativação e, assim, maior estabilidade (SILVA et al., 2018).

Tabela 9 - Parâmetros termodinâmicos para a inativação de primeira ordem da protease parcialmente purificada.

Condição	T (K)	E_a (kJ/mol)	ΔG^\ddagger (kJ/mol)	ΔH^\ddagger (kJ/mol)	ΔS^\ddagger (J/mol·K)
Sem adições	323,15	182,70	98,786	180,013	251,359
	325,65		98,460	179,992	250,367
	328,15		98,107	179,971	249,473
	330,65		97,330	179,951	249,874
	333,15		96,205	179,930	251,312
Mg ²⁺ (10 mM)	323,15	259,46	101,882	256,776	479,326
	325,65		100,665	256,755	479,319
	328,15		99,215	256,735	480,023
	330,65		98,341	256,714	478,974
	333,15		97,055	256,693	479,178
Ca ²⁺ (5 mM)	333,15	296,095	106,256	293,324	561,513
	335,65		103,721	293,304	564,823
	338,15		102,631	293,283	563,809
	340,65		101,280	293,262	563,575
	343,15		100,461	293,241	561,795

No entanto, o uso isolado dos valores de ΔH^\ddagger como indicadores de estabilidade da PPP pode não ser adequado, visto que a estabilidade proteica resulta do balanço entre diversas forças estabilizadoras e desestabilizadoras (BATISTA et al., 2014). Por isso, a ΔG^\ddagger , que representa a barreira energética para a inativação enzimática e, cujo cálculo inclui as contribuições de ΔH^\ddagger e ΔS^\ddagger para a desnaturação, é considerada uma ferramenta mais confiável e precisa para a avaliação da estabilidade enzimática (SOUZA et al., 2015; SILVA et al., 2018). Assim, quanto mais elevados forem os valores de ΔG^\ddagger , maior será a estabilidade (BATISTA et al., 2014; GOUZI et al., 2012), como demonstrado para os experimentos realizados com a PPP de *Bacillus* sp. CL18

na presença de íons, especialmente Ca^{2+} (Tabela 9), onde ΔG^\ddagger alcançou 106,256 kJ/mol.

A maior termoestabilidade na presença de Ca^{2+} está relacionada à associação destes íons a sítios específicos existentes nas serino proteases. A ligação de Ca^{2+} está associada à diminuição da flexibilidade da estrutura enzimática, atuando na manutenção da atividade em temperaturas elevadas. A maior organização estrutural destas proteases devido à ligação de Ca^{2+} também restringe o acesso a sítios de autólise (FAKHFAKH-ZOUARI et al., 2010; DAROIT et al., 2011; KOTLAR et al., 2015; HAMMAMI et al., 2017; GOHEL; SINGH, 2018).

Cabe ressaltar que as temperaturas de 60-70 °C foram usadas para possibilitar os cálculos de parâmetros cinéticos e termodinâmicos da inativação térmica da PPP na presença de Ca^{2+} . Para aplicações em processos enzimáticos, a manutenção da atividade é obviamente fundamental. Logo, mesmo com o incremento da atividade, observado a 60-65 °C na presença de Ca^{2+} (Figura 4), a baixa termoestabilidade da PPP nestas temperaturas (Figura 5c; Tabela 8) recomenda que processos biocatalíticos empregando a PPP sejam realizados na temperatura ótima (55 °C; Tabela 2; Figura 3), com a adição de Ca^{2+} (5 mM; Tabela 5) aos meios reacionais.

Hidrólise de diferentes substratos

Diferentes substratos foram submetidos à hidrólise pela PPP (Tabela 10). A hidrólise de substratos queratinosos (penas, cabelo humano, unhas de frango e humanas), constituídos majoritariamente por proteínas fibrosas, foi inferior àquela de proteínas globulares, o que é comumente observado para proteases microbianas (MUKHERJEE et al., 2008; RATHOD; PATHAK, 2016; HADJIDJ et al., 2018). A menor hidrólise desses materiais pode ser devido a uma maior inacessibilidade do substrato, considerando a estrutura compacta das queratinas (BRANDELLI et al., 2010).

Nesta perspectiva, a hidrólise da farinha de penas foi mais eficiente do que a hidrólise de penas (Tabela 10). De maneira similar, protease de *Bacillus* sp. P45 demonstrou maior hidrólise da farinha de penas em relação às penas e outros substratos queratinosos nativos (DAROIT et al., 2010). A farinha de

penas é resultante do tratamento hidrotérmico de penas, processo que desestabiliza a estrutura das queratinas, representando assim um substrato menos compacto e mais acessível para proteases (DE OLIVEIRA et al., 2017b).

Tabela 10 - Hidrólise de substratos pela protease parcialmente purificada, por 2h, a 55 °C e ph 8,0.

Substrato	Atividade relativa (%) ^a
Caseína	100,0 ± 4,6
Proteína isolada de soja	83,0 ± 2,1*
Albumina sérica bovina	26,8 ± 1,7*
Farinha de penas	19,4 ± 0,8*
Penas de frango	4,5 ± 0,1*
Unha humana	7,6 ± 0,2*
Unha de frango	5,2 ± 0,4*
Cabelo humano	2,8 ± 0,1*

^a O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à hidrólise da caseína.

A hidrólise de caseína e de PIS foi notavelmente superior quando comparada àquela de substratos queratinosos (Tabela 10). A maior afinidade por caseína também é reportada para diversas proteases microbianas quando comparada à hidrólise de outros substratos proteicos (ANNAMALAI et al., 2014; FARHADIAN et al., 2015; GOHEL; SINGH, 2018). Contudo, a capacidade de hidrolisar diferentes substratos, neste caso especificamente a proteína isolada de soja (Tabela 10), é característica importante no contexto da versatilidade enzimática vislumbrando potenciais aplicações (MOTHE; SULTANPURAM, 2016; RAMKUMAR et al., 2018).

As enzimas proteolíticas são amplamente empregadas pela indústria de alimentos. A hidrólise de proteínas alimentares vem sendo empregada na modulação de suas propriedades funcionais, incrementando a solubilidade, a capacidade de formar géis, emulsões, espumas e além disso, os hidrolisados obtidos podem também demonstrar diversas atividades biológicas (AGUILAR; SATO, 2018; TAVANO et al., 2018).

PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS DE PIS E AVALIAÇÃO DE BIOATIVIDADES

Hidrólise da PIS

A partir da atuação da PPP sobre diferentes substratos (Tabela 10), a PIS foi selecionada para a produção de hidrolisados (HPIS). Embora a caseína tenha demonstrado ser mais suscetível à ação da PPP (Tabela 10), investigações acerca da produção de HPIS bioativos usando proteases microbianas não comerciais são relativamente escassas (CASTRO; SATO, 2014). Ainda, pelo fato de ser amplamente disponível e comumente empregada pela indústria de alimentos, a PIS representa uma fonte promissora para a obtenção de peptídeos bioativos (SINGH et al., 2014).

A hidrólise enzimática da PIS, utilizando a PPP de *Bacillus* sp. CL 18 em duas concentrações (2% v/v = HPIS2; 4% v/v = HPIS4), na presença de Ca^{2+} (5 mM), foi monitorada através da determinação de proteína solúvel (Figura 6). Nas condições experimentais (55° C; pH 8,0), verificou-se um aumento na concentração de proteínas solúveis em função do tempo, especialmente até os 180 min de hidrólise (Figura 6).

Após os 180 min de hidrólise, as curvas de proteína solúvel exibiram tendência à estabilização, indicando redução da taxa de hidrólise, assim como reportado para a hidrólise da PIS por diferentes proteases (OLIVEIRA et al., 2014; MEZA-ESPINOZA et al., 2018; CONTI et al., 2019). Este comportamento pode estar relacionado à diminuição do número de ligações peptídicas passíveis de hidrólise no substrato, à competição entre proteínas não hidrolisadas e os peptídeos formados durante a hidrólise pelos sítios ativos da enzima, e mesmo à desnaturação parcial da PPP (CASTRO; SATO, 2014; KEMPKA et al., 2014; GUAN et al., 2018).

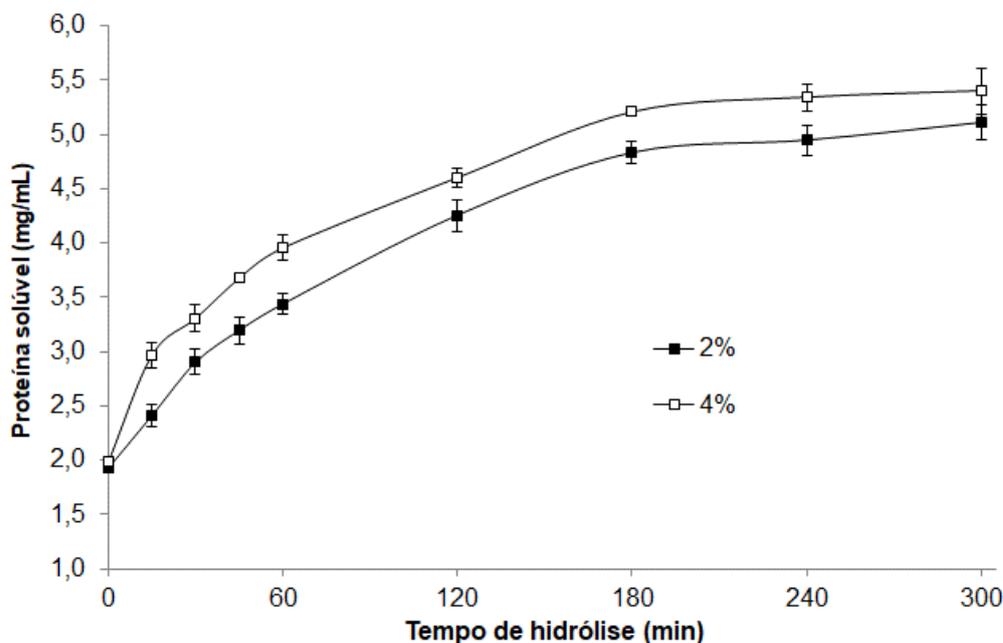


Figura 6 - Hidrólise de PIS, avaliada através da concentração de proteínas solúveis, pela protease parcialmente purificada nas concentrações de 2 e 4% (v/v).

O conteúdo de proteínas solúveis foi maior nos HPIS4 em relação aos HPIS2 (menor) até os 240 min de hidrólise, sendo que ao final dos experimentos (300 min), a diferença não foi significativa ($p > 0,05$). Efeitos de diferentes relações enzima/substrato também foram demonstrados em outros estudos, sendo que maiores relações (representada por HPIS4) usualmente resultam em hidrólise mais rápida da PIS e maior liberação de proteínas solúveis (OLIVEIRA et al., 2015; CONTI et al., 2019).

Potencial antioxidante

O potencial antioxidante de hidrolisados e peptídeos obtidos a partir de proteínas alimentares é temática relevante devido aos danos provocados pelo estresse oxidativo no organismo humano, bem como pela importância de reações de oxidação na redução da qualidade de alimentos (NWACHUKWU; ALUKO, 2019). Assim, a capacidade antioxidante dos HPIS foi avaliada através de quatro ensaios *in vitro*.

Captura do radical ABTS

Os resultados demonstraram que a PIS não hidrolisada (tempo zero) foi capaz de capturar o radical ABTS (~17,5%). No entanto, a hidrólise com a PPP ocasionou incremento da capacidade antioxidante, com a máxima captura (~69%), similar entre HPIS2 e HPIS4, observada após 4 h de hidrólise (Figura 7), representando aumento de 294% em relação à PIS não hidrolisada. Logo, a hidrólise pode resultar na liberação de peptídeos capazes de doar elétrons ao radical ABTS, promovendo sua estabilização (SBROGGIO et al., 2016).

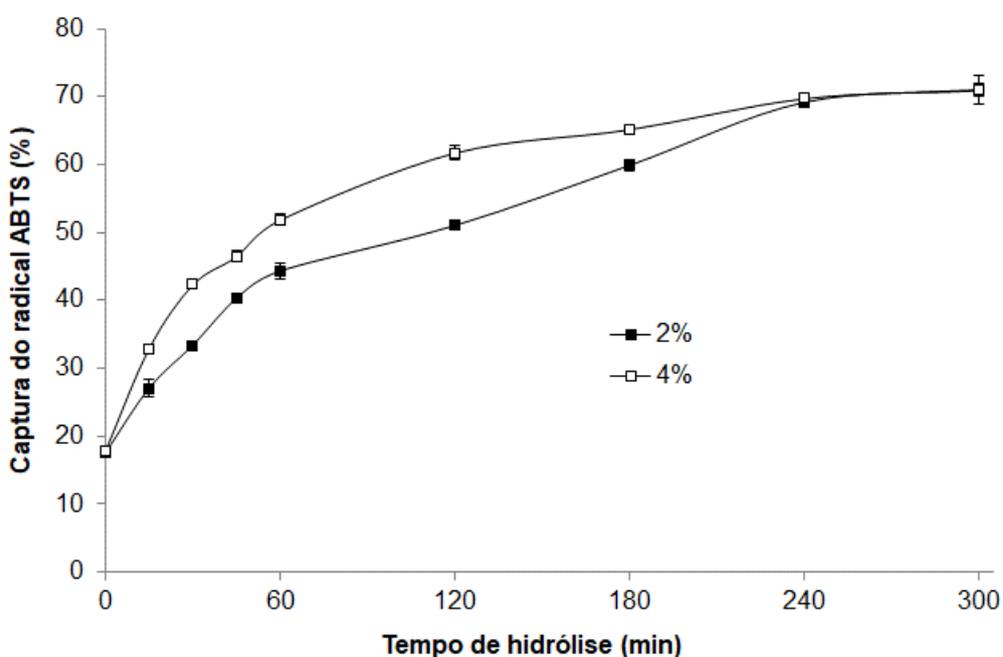


Figura 7 - Captura do radical ABTS por hidrolisados de PIS obtidos em função do tempo de hidrólise e diferentes concentrações de PPP (2 e 4%, v/v).

Efeitos positivos da hidrólise enzimática da PIS sobre a capacidade de captura do radical ABTS vêm sendo demonstrados por outros autores (OLIVEIRA et al., 2015; COSCUETA et al., 2016; MEZA-ESPINOZA et al., 2018; ZHANG et al., 2018). O aumento da captura do radical ABTS também foi reportado para hidrolisados de caseinato de sódio bovino obtidos pela ação de uma PPP bacteriana (HIDALGO et al., 2015).

Particularmente, a PIS não submetida à hidrólise apresentou 26,1% de captura do radical ABTS, que foi elevada para 66,7, 68,7 e 65,2% após 30, 90

e 180 min de hidrólise com uma PPP do látex de frutos de *Maclura pomifera* (JARA et al., 2018), representando acréscimo de ~156% na atividade antioxidante mensurada. Guan et al. (2018) demonstraram que a capacidade de captura do radical ABTS pela PIS (12,7%) foi aumentada durante a hidrólise com uma protease comercial (Corolase PP), atingindo 32,1% após 4 h, ou seja, um incremento de 152%.

Captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

O DPPH é um radical estável que é eliminado quando encontra substâncias antioxidantes com capacidade de doação de elétrons (SHAHIDI; ZHONG, 2015). A PIS não hidrolisada apresentou eliminação de 27%, e os hidrolisados exibiram 42% (HPIS4) e 39% (HPIS2) de captura após 4 h de hidrólise (Figura 8), indicando incremento de 44-55% na capacidade de captura do radical DPPH. A queda da capacidade de captura, observada nos HPIS4 obtidos após 5 h (Figura 8), pode estar relacionada à hidrólise e inativação de peptídeos ativos pela PPP, como observado por Fan et al. (2005) durante a hidrólise de PIS usando pepsina.

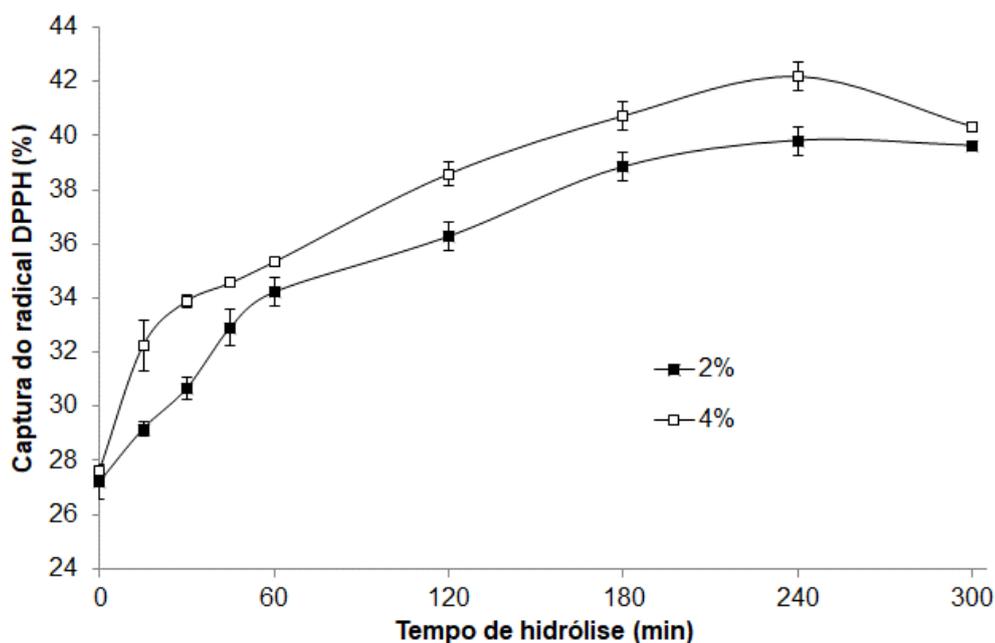


Figura 8 - Captura do radical DPPH por hidrolisados de PIS obtidos em função do tempo de hidrólise e diferentes concentrações de PPP (2 e 4%, v/v).

Na investigação de Oliveira et al. (2014), a capacidade de captura de DPPH pela PIS não hidrolisada (66,7%) foi elevada para 78-79% durante hidrólises realizadas por 30-360 min com uma PPP de *Chryseobacterium* sp. kr6. Hidrolisados de PIS obtidos usando proteases comerciais (ZHANG et al., 2010; CASTRO; SATO, 2015) e uma PPP de *Aspergillus oryzae* LBA 01 (CASTRO; SATO, 2014) também exibiram capacidade de eliminar o radical DPPH. Já Jiménez-Ruiz et al. (2013) reportaram que a hidrólise de PIS por enzimas comerciais (quimotripsina e Flavourzyme) reduziu a capacidade de captura do radical DPPH em relação à PIS não hidrolisada.

As porcentagens de eliminação do radical DPPH em função do tempo de hidrólise não foram tão pronunciadas (Figura 8) em comparação à captura do radical ABTS (Figura 7). Este comportamento, também observado para outros hidrolisados proteicos (CORRÊA et al., 2011; SBROGGIO et al., 2016), pode estar relacionado à estrutura dos peptídeos gerados pela hidrólise, sendo que diferentes peptídeos podem possuir capacidades distintas de reagir e eliminar radicais distintos (OLIVEIRA et al., 2015).

Neste sentido, o radical DPPH somente é solubilizado em solventes orgânicos (como metanol), enquanto que o radical ABTS também é solúvel em meios aquosos (como soluções-tampão). Como os HPIS foram adicionados a ambos os ensaios como soluções aquosas, os peptídeos e os radicais ABTS podem reagir mais facilmente, ao passo que o radical DPPH, por não difundir de forma eficiente no meio reacional, potencialmente restringe sua interação com peptídeos hidrossolúveis nos HPIS (TANG et al., 2010).

Poder redutor

O poder redutor foi avaliado através da capacidade dos HPIS em reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} . A hidrólise provocou aumentos significativos ($p < 0,05$), embora limitados, no poder redutor (0,083-0,200 Abs₇₀₀) em relação à PIS não hidrolisada (0,071 Abs₇₀₀). Notadamente, incrementos em maior taxa foram verificados até os 60 min de hidrólise, sendo que o aumento do poder redutor nos períodos subsequentes demonstrou ser mais gradual (Figura 9).

Aumentos no poder redutor indicam a liberação de peptídeos com capacidade de doar elétrons, podendo atuar na estabilização de moléculas

reativas (CASTRO; SATO, 2015). O poder redutor está associado à capacidade antioxidante visto que os HPIS podem reduzir intermediários oxidados de processos de peroxidação lipídica (SARMADI; ISMAIL, 2010; OLIVEIRA et al., 2014). Com a hidrólise, há uma maior exposição de cadeias laterais polares ou carregadas de aminoácidos, associadas à capacidade redutora de peptídeos (ZHU et al., 2008).

HPIS produzidos utilizando uma protease comercial demonstraram poder redutor superior (0,189 Abs₇₀₀) em relação àquele da PIS não hidrolisada (0,104 Abs₇₀₀) (GUAN et al., 2018). Em relação à PIS não hidrolisada (0,089 Abs₇₀₀), HPIS obtidos após 60, 120 e 240 min de hidrólise com uma PPP de *Chryseobacterium* sp. kr6 exibiram 0,228, 0,213 e 0,249 Abs₇₀₀, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2014). A hidrólise enzimática de PIS por PPPs de frutos *Bromelia pinguin* e *Bromelia karatas* resultou em incremento do poder redutor (MEZA-ESPINOZA et al., 2018), e o potencial de redução de Fe³⁺ também foi reportado para HPIS produzidos com proteases comerciais (ZHANG et al., 2018; WANG et al., 2019).

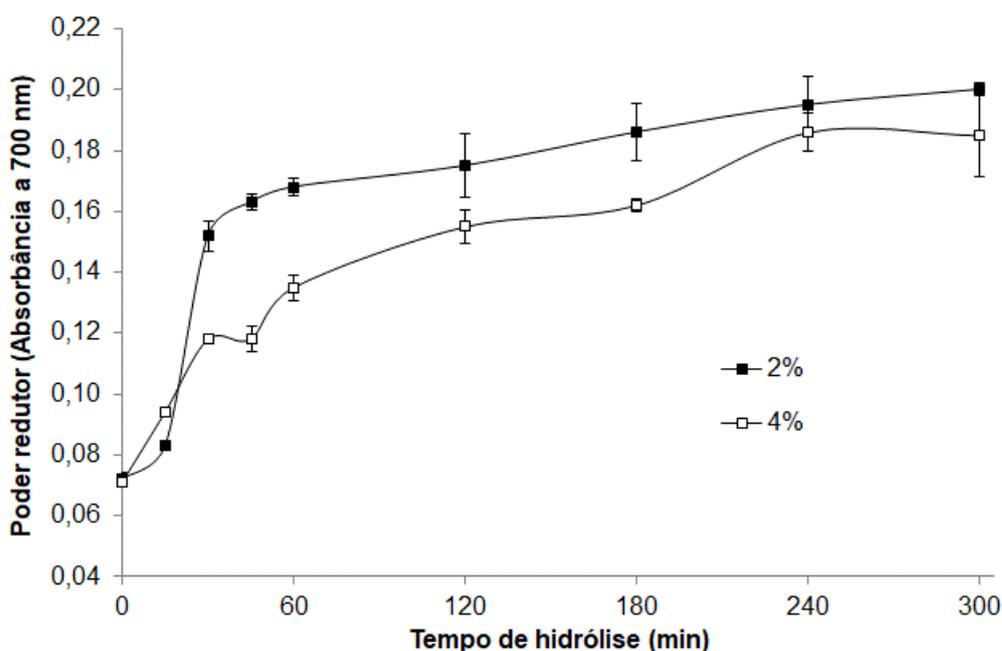


Figura 9 - Poder redutor de hidrolisados de PIS obtidos em função do tempo de hidrólise e diferentes concentrações de PPP (2 e 4%, v/v).

Ao contrário dos resultados para a captura de radicais (Figuras 7 e 8), maior poder redutor foi detectado nos HPIS2 (Figura 9). Embora maiores

relações enzima/substrato estejam usualmente relacionadas a hidrólises mais eficientes, o poder redutor (bem como outras bioatividades) de hidrolisados não está necessariamente associado ao nível de hidrólise, mas sim às propriedades dos peptídeos contidos nos hidrolisados (MOURE et al., 2006; LIU et al., 2012).

Atividade quelante de ferro

Metais de transição, como íons ferrosos (Fe^{2+}), catalisam a formação de radicais hidroxilas (OH.), potentes agentes causadores de danos oxidativos nas células. Assim, a quelação de Fe^{2+} é um dos principais mecanismos que contribui para a capacidade antioxidante de hidrolisados proteicos (ARISE et al., 2016). Radicais livres, cuja geração é induzida por Fe^{2+} , também são agentes importantes em processos de peroxidação lipídica em alimentos; logo, a indisponibilização destes íons auxilia a retardar a peroxidação e, com isso, o surgimento de rancidez alimentar (ZHANG et al., 2010).

A PIS não hidrolisada apresentou capacidade quelante de Fe^{2+} de 38%, enquanto que os diferentes HPIS produzidos demonstraram pequenas variações, entre 34,7 a 43,8%, indicando pequena contribuição da hidrólise sobre este parâmetro (Figura 10). Embora não tenham sido observados padrões consistentes de aumento ou queda durante as hidrólises, a quelação de Fe^{2+} demonstrou ser superior aos controles ($p < 0,05$) após 30, 60 e 120 min de hidrólise nos HPIS2 e após 30 e 60 min de hidrólise nos HPIS4 (Figura 10).

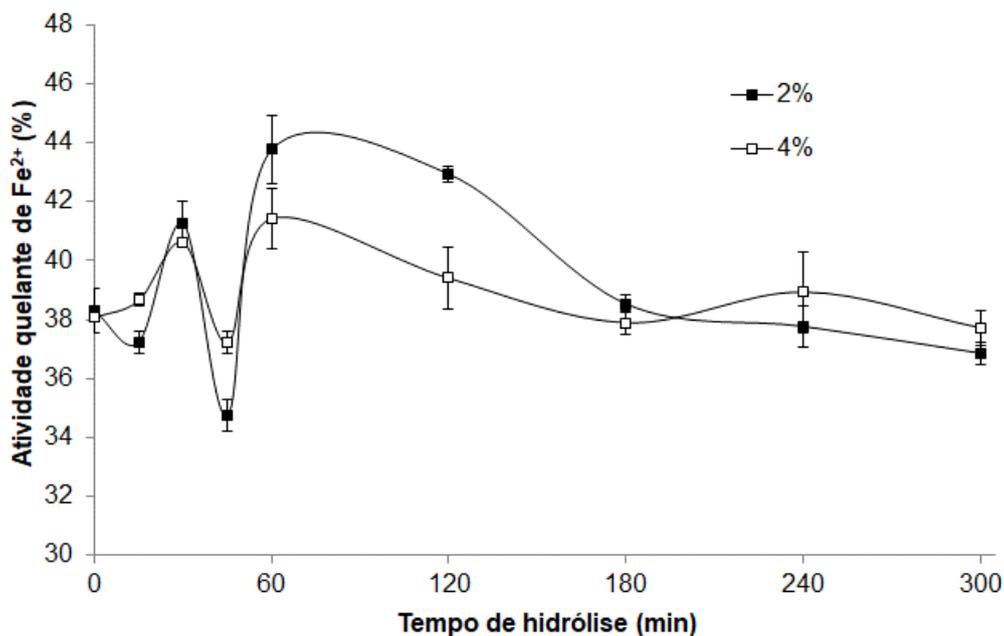


Figura 10 - Capacidade quelante de Fe²⁺ de hidrolisados de PIS obtidos em função do tempo de hidrólise e diferentes concentrações de PPP (2 e 4%, v/v).

Em contrapartida, outras investigações indicam que a hidrólise da PIS contribuiu claramente para o incremento da capacidade quelante de Fe²⁺ (LIU et al., 2012; ZHANG et al., 2010, 2018). Variações sobre a capacidade quelante foram indicadas por Oliveira et al. (2014) durante a hidrólise de PIS por uma PPP bacteriana. A porcentagem máxima de quelação (61,0%) foi observada após 1 h de hidrólise, que então decresceu e estabilizou em hidrólises realizadas por até 6 h, com porcentagens de quelação (15,4-22,4%) similares ou inferiores à PIS não hidrolisada (23,8%), o que pode derivar da clivagem de peptídeos capazes de quelar Fe²⁺ (OLIVEIRA et al., 2014).

No entanto, similarmente ao presente estudo, pequenas variações na capacidade de quelação de Fe²⁺ (70,8-83,3%) foram reportadas para hidrolisados de caseinato de sódio ovino obtidos com a PPP de *Bacillus* sp. P7, em comparação ao caseinato não hidrolisado (76,2%) (CORRÊA et al., 2011). A manutenção da capacidade quelante dos HPIS em relação à PIS sugere que a hidrólise pode ter originado peptídeos quelantes. Baixas concentrações de peptídeos capazes de quelar Fe²⁺, ou a capacidade quelante restrita dos peptídeos gerados podem auxiliar a explicar tais resultados (ZHANG et al., 2010, 2018; ARISE et al., 2016).

Assim, os HPIS obtidos demonstraram atividades antioxidantes através da captura de radicais (ABTS e DPPH) e da redução de Fe^{3+} (Figuras 7-9). Em peptídeos, tais atividades estão majoritariamente associadas à presença de aminoácidos hidrofóbicos e/ou aromáticos (como triptofano, fenilalanina, prolina, glicina, lisina, isoleucina e valina), capazes de doar elétrons e estabilizar radicais. Resíduos de histidina em peptídeos podem atuar como importantes doadores de hidrogênio (prótons) a moléculas oxidantes. Aminoácidos carregados negativamente (como glutamato e aspartato), também podem capturar radicais e reduzir cátions devido à rápida transferência de elétrons. Contudo, a posição dos aminoácidos e a massa molecular também influenciam a capacidade antioxidante dos peptídeos, propriedades relacionadas ao substrato, à enzima e às condições de hidrólise (SARMADI; ISMAIL, 2010; ZOU et al., 2016; NWACHUKWU; ALUKO, 2019).

Potencial anti-hipertensivo

A hipertensão é uma doença crônica proeminente na população humana, manifestada por elevação anormal da pressão sanguínea devido ao relaxamento insuficiente dos vasos sanguíneos e reduzido fluxo sanguíneo, que pode levar a graves doenças cardiovasculares e, por vezes, morte. A ACE é uma protease que desempenha importante papel neste processo, visto que sua atuação sobre a angiotensina-I resulta na produção do peptídeo vasoconstritor angiotensina-II; ainda, a ACE cliva e inativa a bradicinina, um peptídeo vasodilatador (ALUKO, 2015).

Considerando a relevância crítica desta enzima, esta tem se tornado alvo de fármacos destinados ao controle da pressão sanguínea e hipertensão. Assim, avaliações do potencial anti-hipertensivo de hidrolisados proteicos são usualmente realizadas, *in vitro*, através da capacidade em inibir a atividade da ACE (BECHAUX et al., 2019).

A inibição da ACE pelos HPIS é apresentada na Figura 11, onde pode-se observar que a inibição foi incrementada pela hidrólise, atingindo valores máximos de 83,8-89,1% nos HPIS4 obtidos após 120-300 min de hidrólise, com valores estatisticamente similares ($p > 0,05$) entre os hidrolisados obtidos nestes tempos. Nos HPIS 2, as máximas inibições (65,6-70,5%) foram

mensuradas aos 240-300 min de hidrólise. No entanto, cabe notar que 68,3% (HPIS4) e 40,9% (HPIS2) de inibição da ACE foram detectados após 60 min de hidrólise, em comparação com inibições de 8-12% causadas pela PIS não hidrolisada (Figura 11).

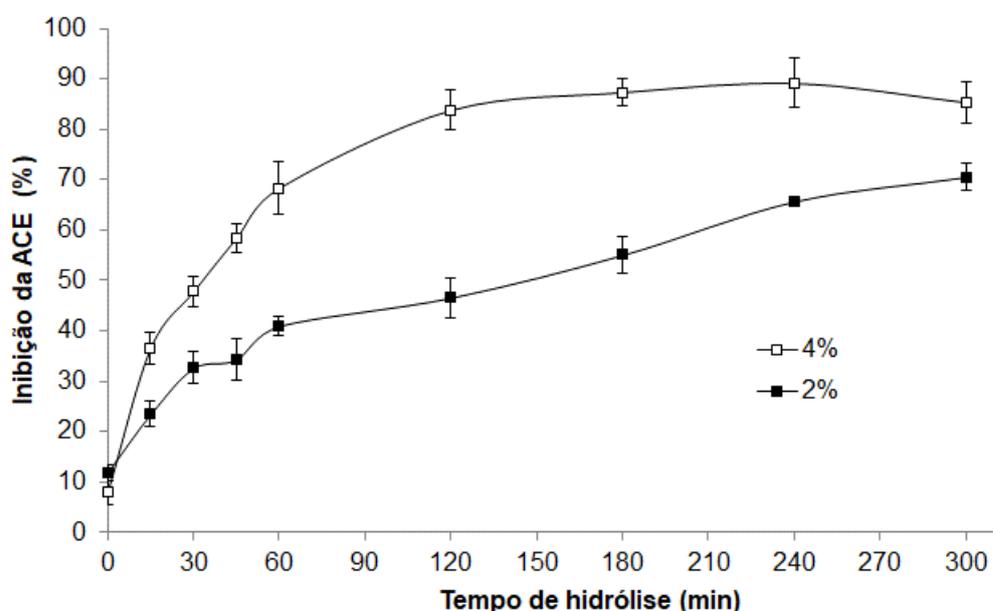


Figura 11 - Inibição da ACE, in vitro, por hidrolisados de PIS obtidos em função do tempo de hidrólise e diferentes concentrações de PPP (2 e 4%, v/v).

Hidrolisados de PIS exibiram 20-73% de inibição ACE, dependendo da protease utilizada e das condições de hidrólise, em comparação à PIS não submetida à hidrólise (~3,3%) (LEE et al., 2008). Daliri et al. (2019) demonstraram que a hidrólise, por 60 min, com uma enzima comercial (Prozyme 2000P), incrementou a inibição da ACE pelos hidrolisados (60,8%) em relação à PIS não hidrolisada (10,2%).

A hidrólise da PIS por uma protease de *Bacillus* sp. SS103 (CHA; PARK, 2005) e por proteases comerciais (COSCUETA et al., 2016; RUDOLPH et al., 2017; GUAN et al., 2018; WANG et al., 2019) também resultou em incremento da inibição da ACE. O aumento da capacidade de inibição demonstra que a hidrólise foi fundamental à liberação de peptídeos inibidores a partir da PIS (CHIANG et al., 2006; LEE et al., 2008). Peptídeos com esta capacidade usualmente possuem aminoácidos aromáticos e/ou hidrofóbicos em sua sequência, particularmente na região C-terminal (ALUKO, 2015).

Potencial antidiabético

A protease DPP IV está envolvida na regulação da glicemia pós-prandial, visto que inativa o peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP1) e o polipeptídeo inibitório gástrico (GIP), hormônios responsáveis por estimular a produção de insulina pelas células β do pâncreas. Considerando que o diabetes tipo 2, responsável por 90% dos casos de diabetes no mundo, é caracterizado por disfunções na produção de insulina e resistência à insulina nos tecidos, a inibição da DPP IV pode prolongar o efeito insulínico de GIP e GLP1 e contribuir no combate à hiperglicemia (LIU et al., 2019; TAN et al., 2019).

A hidrólise da PIS ocasionou aumento da inibição da DPP IV. HPIS2 e HPIS4 demonstraram máxima inibição de 29,4-31,6% e 32,9-34,8% após 240-300 min de hidrólise, respectivamente (Figura 12). Em cada hidrolisado, as diferenças entre 240 e 300 min de hidrólise não foram significativas ($p > 0,05$). Peptídeos capazes de inibir a atuação da DPP IV podem ser obtidos, por exemplo, a partir de proteínas do leite (NONGONIERMA; FITZGERALD, 2013) e da soja (GONZÁLEZ-MONTOYA et al., 2018).

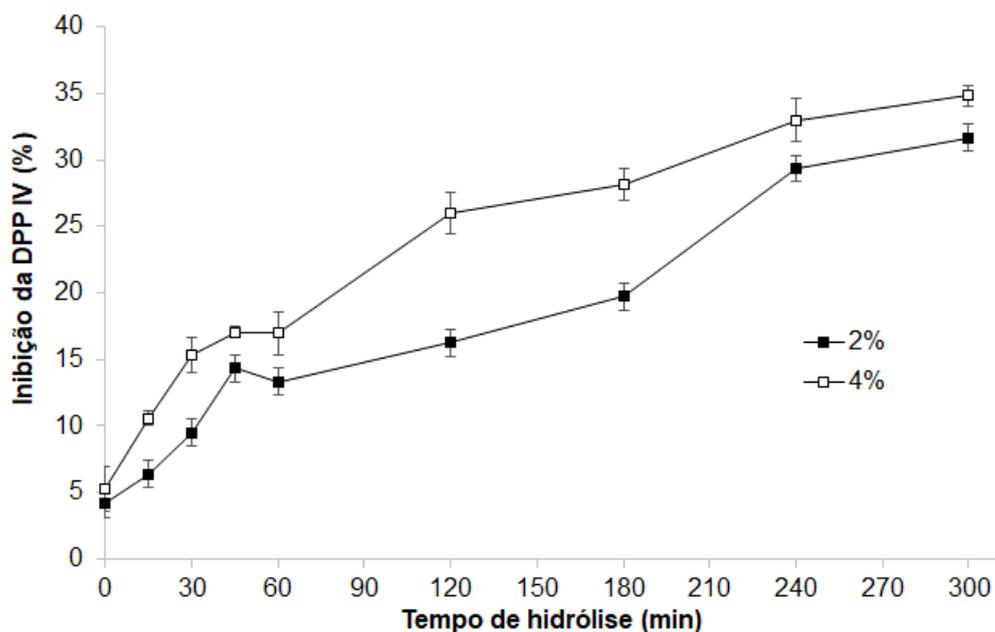


Figura 12 - Inibição da DPP IV, in vitro, por hidrolisados de PIS obtidos em função do tempo de hidrólise e diferentes concentrações de PPP (2 e 4%, v/v).

A hidrólise da PIS por uma protease alcalina comercial originou hidrolisados com capacidade de inibir em cerca de 40% a atividade da DPP IV (WANG et al., 2019). Hidrolisados de proteína de soja, obtidos através da hidrólise enzimática com a protease comercial bromelina, inibiram a DPP IV (HSIEH et al., 2016). De forma análoga, incrementos na inibição da DPP IV foram descritos para hidrolisados de proteína de soja produzidos por proteases comerciais derivadas de *Bacillus* e do látex de *Carica papaya* (NONGONIERMA; FITZGERALD, 2015). A presença de aminoácidos hidrofóbicos na posição *N*-terminal, seguida de alanina, prolina ou aminoácidos neutros na posição subsequente, é característica comum para peptídeos capazes de inibir a DPP IV (POWER et al., 2014; LACROIX; LI-CHAN, 2016).

CONCLUSÃO

A PPP de *Bacillus* sp. CL18, caracterizada como serino protease, apresentou atividade ótima a 51-59 °C e pH 7,4-8,8, dependendo de Ca²⁺ (5 mM) para maior atividade e incremento da estabilidade térmica. Esta PPP demonstrou, particularmente, capacidade de hidrolisar caseína e PIS, proteínas amplamente utilizadas pela indústria de alimentos.

A máxima atividade em temperaturas moderadas sugere menores demandas energéticas quando comparadas àquelas de bioprocessos utilizando proteases termofílicas. A baixa termoestabilidade é considerada propriedade interessante, permitindo o efetivo e fácil controle da atividade da PPP em processos biocatalíticos, como na produção de hidrolisados proteicos.

A PPP foi empregada na produção de hidrolisados de PIS, que exibiram potenciais antioxidantes (captura de radicais e poder redutor), antidiabético e anti-hipertensivo *in vitro*. Estas bioatividades apresentaram-se mais elevadas, via de regra, em hidrólises realizadas por 4 h.

Em suma, a PPP de *Bacillus* sp. CL18 representa um biocatalisador para a obtenção de hidrolisados bioativos multifuncionais, que podem encontrar aplicações na área de ciência e tecnologia de alimentos. A purificação e a identificação dos peptídeos responsáveis pelas bioatividades observadas surgem como perspectivas para investigações futuras.

REFERÊNCIAS

- ABU-KHUDIR, R.; SALEM, M. M.; ALLAM, N. G.; ALI, E. M. M. Production, Partial Purification, and Biochemical Characterization of a Thermotolerant Alkaline Metallo-protease from *Staphylococcus sciuri*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, p. 87-102, 2019.
- AGUILAR, J. G. S.; CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* LBA 46 in a bench reactor: effect of temperature and agitation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 615-625, 2019.
- AGUILAR, J. G. S.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253–262, 2018.
- ALUKO, R. E. Antihypertensive Peptides from Food Proteins. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 6, p. 235-262, 2015.
- ANBU, P. Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 56, p. 162-168, 2013.
- ANNAMALAI, N.; RAJESWARI, M. V.; SAHU, S. K.; 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 Biochemistry**, v. 49, p. 1012-1019, 2014.
- ARISE, A. K.; ALASHI, A. M.; NWACHUKWU, I. D.; IJABADENIY, O. A.; ALUKO, R. E.; AMONSOU, E. O. Antioxidant activities of bambara groundnut (*Vigna subterranea*) protein hydrolysates and their membrane ultrafiltration fractions. **Food & Function**, v. 7, n. 5, p. 2431–2437, 2016.
- BANERJEE, G.; RAY, A. K. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 33, n. 2, p. 119-143, 2017.
- BATISTA, K. A.; BATISTA, G. L. A.; ALVES, G. L.; FERNANDES, K. F. Extraction, partial purification and characterization of polyphenol oxidase from *Solanum lycocarpum* fruits. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 102, p. 211-217, 2014.

- BECHAUX, J.; GATELLIER, P.; PAGE, J. P. L.; DRILLET, Y.; SANTE-LHOUTELLIER, V. A comprehensive review of bioactive peptides obtained from animal byproducts and their applications. **The Royal Society of Chemistry**, v. 10, p. 6244–6266, 2019.
- BHANGE, K. CHATURVEDI, V.; BHATT, R. Simultaneous production of detergent stable keratinolytic protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste. **Biotechnology Reports**, v. 10, p. 94-104, 2016.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.
- BOSE, A.; CHAWDHARY, V.; KEHARIA, H.; SUBRAMANIAN, R. B. Production and characterization of a solvent-tolerant protease from a novel marine isolate *Bacillus tequilensis* P15. **Annals of Microbiology**, v. 64, p. 343-354, 2014b.
- BOSE, A.; PATHAN, S.; PATHAK, K.; KEHARIA, H. Keratinolytic Protease Production by *Bacillus amyloliquefaciens* 6B Using Feather Meal as Substrate and Application of Feather Hydrolysate as Organic Nitrogen Input for Agricultural Soil. **Waste Biomass Valor**, v. 5, p. 595-605, 2014a.
- BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1735–1750, 2010.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food and Science Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- CALLEGARO, K.; WELTER, N.; DAROIT, D. J. Feathers as bioresource: Microbial conversion into bioactive protein hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 01-09, 2018.
- CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Antioxidant activities and functional properties of soy protein isolate hydrolysates obtained using microbial proteases. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 317–328, 2014.
- CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Synergistic actions of proteolytic enzymes for production of soy protein hydrolysates with antioxidant activities: An approach based on enzymes specificities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 694-702, 2015.

- CHA, M.; PARK, J. R. Production and Characterization of a Soy Protein-Derived Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Hydrolysate. **Journal of Medicinal food**, v. 8, n. 3, p. 305-310, 2005.
- CHANG, C. Y.; WU, K. C.; CHIANG, S. H. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1537-1543, 2007.
- CHATTERJEE, C.; GLEDDIE, S.; XIAO, C. Soybean Bioactive Peptides and Their Functional Properties. **Nutrients**, v. 10, p. 1-16, 2018.
- CHATTERJEE, J.; GIRI, S.; MAITY, S.; SINHA, A.; RAJSHEKHAR, A. R.; GUPTA, S. Production and characterization of thermostable alkaline protease of *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) from optimized solid-state fermentation. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 62, n. 5, p. 709-718, 2015.
- CHENG, K.; LU, F.; LI, M.; LIU, L.; LIANG, X. Purification and biochemical characterization of a serine alkaline protease TC4 from a new isolated *Bacillus alcalophilus* TCCC11004 in detergent formulations. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 31, p. 4942-4953, 2010.
- CHIANG, W.; TSOU, M.; TSAI, Z.; TSAI, T. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor. **Food Chemistry**, v. 98, p. 725-732, 2006.
- CONTESINI, F. J.; MELO, R. R.; SATO, H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 321-334, 2018.
- CONTI, J. P.; VINDEROLA, G.; ESTEBAN, E. N. Characterization of a soy protein hydrolyzate for the development of a functional ingredient. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 896-904, 2019.
- CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinase produced by *Bacillus* sp. P7 isolated from an Amazonian environment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 1-6, 2010.
- CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; COELHO, J.; MEIRA, S. M. M.; LOPES, F. C.; SEGALIN, J.; RISSO, P. H.; BRANDELLI, A. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of food and agriculture**, v. 91, p. 2247-2254, 2011.

COSCUETA, E. R.; AMORIM, M. M.; VOSS, G. B.; NERLI, B. B.; PICÓ, G. A.; PINTADO, M. E. Bioactive properties of peptides obtained from Argentinian defatted soy flour protein by Corolase PP hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 198, p. 36-44, 2016.

CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. **Biochemical Pharmacology**, v. 20, p. 1637-1648, 1971.

DALIRI, E. B. M.; OFOSU, F. K.; CHELLIAH, R.; PARK, M. H.; KIM, J. H.; OH, D. H. Development of a Soy Protein Hydrolysate with an Antihypertensive Effect. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1-12, 2019.

DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. A current assessment on the production of bacterial keratinases. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 372-384, 2014.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 358-363, 2009.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 28, p. 370-379, 2010.

DAROIT, D. J.; SANT'ANNA, V.; BRANDELLI, A. Kinetic stability modelling of keratinolytic protease P45: Influence of temperature and metal ions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 165, p. 1740-1753, 2011.

DE OLIVEIRA, C. T.; PEREIRA, J. Q.; BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J. Prospecting soil bacteria from subtropical Brazil for hydrolases production. **Biologia**, v. 72, p. 130-139, 2017a.

DE OLIVEIRA, C. T.; RIEGER, T. J.; DAROIT, D. J. Catalytic properties and thermal stability of a crude protease from the keratinolytic *Bacillus* sp. CL33A. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 270-277, 2017b.

FAKHFAKH-ZOUARI, N.; HMIDET, N.; HADDAR, A.; KANOUN, S.; NASRI, M. A Novel Serine Metallokeratinase from a Newly Isolated *Bacillus pumilus* A1

- Grown on Chicken Feather Meal: Biochemical and Molecular Characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 329-344, 2010.
- FAN, J. SAITO, M.; YANYAN, Z.; SZESZE, T.; WANG, L.; TATSUMI, E.; LI, L. Gel-forming Ability and Radical scavenging Activity of Soy Protein Hydrolysate Treated with Transglutaminase. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 70, n. 1, p. 87-92, 2005.
- FARHADIAN, S.; ASOODEH, A.; LAGZIAN, M. Purification, biochemical characterization and structural modeling of a potential htrA-like serine protease from *Bacillus subtilis* DR8806. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 51–58, 2015.
- FERRAREZE, P. A. G.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Purification and characterization of a keratinolytic protease produced by probiotic *Bacillus subtilis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 102–109, 2016.
- GIRI, S. S.; SUKUMARAN, V.; SEN, S. S.; OVIYA, M.; BANU, B. N.; JENA, P. K. Purification and partial characterization of a detergent and oxidizing agent stable alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* VSG-4 of a tropical soil. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 455-461, 2011.
- GOHEL, S. D.; SINGH, S. P. Thermodynamics of a Ca²⁺ dependent, highly thermostable and detergent compatible purified alkaline serine protease from *Nocardiopsis xinjiangensis* strain OM-6. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 565-574, 2018.
- GONZÁLEZ-MONTOYA, M.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; MORA-ESCOBEDO, R.; MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C. Bioactive Peptides from Germinated Soybean with Anti-Diabetic Potential by Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-IV, α -Amylase, and α -Glucosidase Enzymes. **International journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 1-14, 2018.
- GOUZI, H.; DEPAGNE, C.; CORADIN, T. Kinetics and Thermodynamics of the Thermal Inactivation of Polyphenol Oxidase in an Aqueous Extract from *Agaricus bisporus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 500-506, 2012.
- GUAN, H.; DIAO, X.; JIANG, F.; HAN, J.; KONG, B. The enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by Corolase PP under high hydrostatic pressure and its effect on bioactivity and characteristics of hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 245, p. 89-96, 2018.

- GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 70, p. 21-33, 2006.
- GURUMALLESH, P.; ALAGU, K.; RAMAKRISHNAN, B.; MUTHUSAMY, S. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254–267, 2019.
- HADDAR, A.; BOUGATEF, A.; AGREBI, R.; SELLAMI-KAMOUN, A.; NASRI, M. A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 29-35, 2009.
- HADJIDJ, R.; BADIS, A.; MECHRI, S.; EDDOUAOUDA, K.; KHELOUIA, L.; ANNANE, R.; HATTAB, M. E.; JAOUADI, B. Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 1033-1048, 2018.
- HAMMAMI, A.; HAMDY, M.; ABDELHEDI, O.; JRIDI, M.; NASRI, M.; BAYOUDH, A. Surfactant- and oxidant-stable alkaline proteases from *Bacillus invictae*: Characterization and potential applications in chitin extraction and as a detergent additive. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 272-281, 2017.
- HIDALGO, M. E.; CORRÊA, A. P. F.; CANALES, M. M.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A.; RISSO, P. H. Biological and physicochemical properties of bovine sodium caseinate hydrolysates obtained by a bacterial protease preparation. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 510-520, 2015.
- HSIEH, C.; WANG, T.; HUNG, C.; JAO, C.; HSIEH, Y.; WUD, S.; HSU, K. *In silico*, *in vitro* and *in vivo* analyses of dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity and the antidiabetic effect of sodium caseinate hydrolysate. **Food & Function**, v. 7, n. 2, p. 1122–1128, 2016.
- HUMMEL, K. M.; PENHEITER, A. R.; GATHMAN, A. C.; LILLY, W. W. Anomalous estimation of protease molecular weights using gelatin-containing SDS – PAGE. **Analytical Biochemistry**, v. 233, n. 19, p. 140-142, 1996.
- JARA, A. M. R.; LIGGIERI, C. S.; BRUNO, M. A. Preparation of soy protein hydrolysates with antioxidant activity by using peptidases from latex of *Maclura pomifera* fruits. **Food Chemistry**, v. 264, p. 326–333, 2018.

- JIMÉNEZ-RUIZ, E.; BARCA, A. M. C.; SOTELO-MUNDO, R. R.; ARTEAGA-MACKINNEY, G. E.; VALENZUELA-MELENDZ, M.; PENA-RAMOS, E. A. Partial Characterization of Ultrafiltrated Soy Protein Hydrolysates with Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 8, p. 151-158, 2013.
- KAMAL, S.; REHMAN, S.; IQBAL, H. M. N. Biotechnological Valorization of Proteases: From Hyperproduction to Industrial Exploitation—A Review. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 36, n. 2, p. 511-522, 2017.
- KEMPKA, A. P.; HONAISSER, T. C.; FAGUNDES, E.; PRESTES, R. C. Functional properties of soy protein isolate of crude and enzymatically hydrolysed at different times. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 6, p. 2229-2236, 2014.
- KLEIN, M. P.; Sant'Ana, V.; HERTZ, P. F.; RODRIGUES, R. C.; NINOW, J. L. Kinetics and Thermodynamics of Thermal Inactivation of β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, p. 1-12, 2018.
- KOTLAR, C.; PONCE, A.; ROURA, S. Characterization of a novel protease from *Bacillus cereus* and evaluation of an eco-friendly hydrolysis of a brewery byproduct. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, p. 558-565, 2015.
- LACROIX, I. M. E.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived dipeptidyl-peptidase IV inhibitors as a potential approach for glycemic regulation e Current knowledge and future research considerations. **Trends in Food Science & Technology**, v. 54, p. 1-16, 2016.
- LACROIX, I. M. E.; LI-CHAN, E. C. Y. Inhibition of Dipeptidyl Peptidase (DPP)-IV and α -glucosidase activities by pepsin-treated whey proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 7500-7506, 2013.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680 – 685, 1970.
- LEE, J.; YOO, M. A.; KOO, S. H.; BAEK, H.; LEE, H. G. Antioxidant and ACE Inhibitory Activities of Soybean Hydrolysates: Effect of Enzyme and Degree of Hydrolysis. **Food Science and Biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 873-877, 2008.
- LIU, P. HUANG, M.; SONG, S.; HAYAT, K.; ZHANG, X.; XIA, S.; JIA, C. Sensory Characteristics and Antioxidant Activities of Maillard Reaction Products

from Soy Protein Hydrolysates with Different Molecular Weight Distribution. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 5, p. 1775-1789, 2012.

LIU, R.; CHENG, J.; WU, H. Discovery of Food-Derived Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitory Peptides: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 1-22, 2019.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193. p. 265-275, 1951.

MEZA-ESPINOZA, L.; SÁYAGO-AYERDI, S. G.; GARCÍA-MAGAÑA, M. L.; TOVAR-PÉREZ, E. G.; YAHIA, E. M.; VALLEJO-CORDOBA, B.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.; MONTALVO-GONZÁLEZ, E. Antioxidant capacity of egg, milk and soy protein hydrolysates and biopeptides produced by *Bromelia pinguin* and *Bromelia karatas*-derived proteases. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 30, n. 2, p. 122-130, 2018.

MISHRA, V. K. Optimization of thermotolerant alkaline protease production from *Brevibacillus brevis* strain BT2 using surface response methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 87-94, 2016.

MOTHE, T.; SULTANPURAM, V. R. Production, purification and characterization of a thermotolerant alkaline serine protease from a novel species *Bacillus caseinilyticus*. **Biotech**, v. 6, n. 53, p. 1-10, 2016.

MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 447-456, 2006.

MUKHERJEE, A. K.; ADHIKARI, H.; RAI, S. K. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of enzyme in detergent formulation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 353-361, 2008.

NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk protein-derived dipeptides and hydrolysates. **Peptides**, v. 39, p. 157-163, 2013.

NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. Investigation of the Potential of Hemp, Pea, Rice and Soy Protein Hydrolysates as a Source of Dipeptidyl

Peptidase IV (DPP-IV) Inhibitory Peptides. **Food Digestion In Press**, v. 1, p. 1-11, 2015.

NWACHUKWU, I. D.; ALUKO, R. E. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 1-13, 2019.

OLIVEIRA, C. F.; COLETTI, D.; CORREA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; TONIOLO, R.; CLADERA-OLIVEIRA, F.; BRANDELLI, A. Antioxidant activity and inhibition of meat lipid oxidation by soy protein hydrolysates obtained with a microbial protease. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 775-781, 2014.

OLIVEIRA, C. F.; CORREA, A. P. F.; COLETTI, D.; DAROIT, D. J.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. 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.

POWER, O.; NONGONIERMA, A. B.; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R. J. Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, p. 34-46, 2014.

RAMKUMAR, A.; SIVAKUMAR, N.; GUJARATHI, A. M.; VICTOR, R. Production of thermotolerant, detergent stable alkaline protease using the gut waste of *Sardinella longiceps* as a substrate: Optimization and characterization. **Scientific reports**, v. 8, p. 1-15, 2018.

RATHOD, M. G.; PATHAK, A. P. Optimized production, characterization and application of alkaline proteases from taxonomically assessed microbial isolates from Lonarsoda lake, India. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 164-173, 2016.

RAZZAQ, A.; SHAMSI, S.; ALI, A.; ALI, Q.; SAJJAD, M.; MALIK, A.; ASHRAF, M. Microbial Proteases Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 1-20, 2019.

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

RIEGER, T. J.; DE OLIVEIRA, C. T.; PEREIRA, J. Q.; BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J. Proteolytic system of *Bacillus* sp. CL18 is capable of extensive

feather degradation and hydrolysis of diverse protein substrates. **British Poultry Science**, v. 58, p. 329-335, 2017.

RUDOLPH, S.; LUNOW, D.; KAISER, S.; HENLE, T. Identification and quantification of ACE-inhibiting peptides in enzymatic hydrolysates of plant proteins. **Food Chemistry**, v. 224, p. 19-25, 2017.

SAGGU, S. K.; MISHRA, P. C. Characterization of thermostable alkaline proteases from *Bacillus infantis* SKS1 isolated from garden soil. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1-18, 2017.

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

SATHISHKUMAR, R.; ANANTHAN, G.; ARUN, J. Production, purification and characterization of alkaline protease by ascidian associated *Bacillus subtilis* GA CAS8 using agricultural wastes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 214-220, 2015.

SBROGGIO, M. F.; MONTILHA, M. S.; FIGUEIREDO, V. R. G.; GEORGETTI, S. R.; KUROZAWA, L. E. Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 375-381, 2016.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757–781, 2015.

SHARMA, M.; GAT, Y.; ARYA, S.; KUMAR, V.; PANGHAL, A.; KUMAR, A. A Review on Microbial Alkaline Protease: An Essential Tool for Various Industrial Approaches. **Industrial Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 69-78, 2019.

SINGH, B. P.; VIJ, S.; HATI, S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v. 54, p. 171–179, 2014.

SILVA, O. S.; OLIVEIRA, R. L.; SILVA, J. C.; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Thermodynamic investigation of an alkaline protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: A comparative approach between crude extract and purified enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1039-1044, 2018.

SILVA, R. R. Bacterial and Fungal Proteolytic Enzymes: Production, Catalysis and Potential Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 1, p. 1-19, 2017.

SILVEIRA, S. T.; CASARIN, F.; GEMELLI, S.; BRANDELLI, A. Thermodynamics and Kinetics of Heat Inactivation of a Novel Keratinase from *Chryseobacterium* sp. Strain kr6. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 548–560, 2010.

SOBUCKI, L.; RAMOS, R. F.; DAROIT, D. J. Protease production by the keratinolytic *Bacillus* sp. CL18 through feather bioprocessing. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 23125-23132, 2017.

SOUZA, P. M.; ALIAKBARIAN, B.; FERREIRA FILHO, E. X.; MAGALHÃES, P. O.; PESSOA JUNIOR, A.; CONVERTI, A.; PEREGO, P. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 17-21, 2015.

TANG, X.; HE, Z.; DAI, Y.; XIONG, Y. L.; XIE, M.; CHEN, J. Peptide Fractionation and Free Radical Scavenging Activity of Zein Hydrolysate. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 58, p. 587-593, 2010.

TAN, S. Y.; WONG, J. L. M.; SIM, Y. J.; WONG, S.; ELHASSAN, S. A. M.; TAN, S. H.; LIM, G. P. L.; TAY, N. W. R.; ANNAN, N. C.; BHATTAMISRA, S. K.; CANDASAMY, M. Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, p. 364-372, 2019.

TATINENI, R.; DODDAPANENI, K. K.; POTUMARTHI, R. C.; VELLANKI, R. N.; KANDATHIL, M. T.; KOLLI, N.; MANGAMOORI, L. N. Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces* sp. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1596–1602, 2008.

TAVANO, O. L.; MURCIA, A. B.; SECUNDO, F.; LAFUENTE, R. F. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, p. 412-436, 2018.

VENUGOPAL, M.; SARAMMA, A. V. Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1239–1243, 2006.

VERMA, J.; PANDEY, S. Characterization of partially purified alkaline protease secreted by halophilic bacterium *Citricoccus* sp. isolated from agricultural soil of

northern India. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 605-612, 2019.

VIANA, D. A.; LIMA, C. A.; NEVES, R. P.; MOTA, C. S.; MOREIRA, K. A.; LIMA-FILHO, J. L.; CAVALCANTI, M. T. H.; CONVERTI, A.; PORTO, A. L. F. Production and Stability of Protease from *Candida buinensis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 830-842, 2010.

WANG, R.; ZHAO, H.; PAN, X.; ORFILA, C.; LU, W.; MA, Y. Preparation of bioactive peptides with antidiabetic, antihypertensive, and antioxidant activities and identification of α -glucosidase inhibitory peptides from soy protein. **Food Science & Nutrition**, v. 7, p. 1848-1856, 2019.

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 Technology**, v. 101, p. 2084–2089, 2010.

ZHANG, Q.; TONG, X.; SUI, X.; WANG, Z.; QI, B.; LI, Y.; JIANG, L. Antioxidant activity and protective effects of Alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate in human intestinal epithelial Caco-2 cells. **Food Research International**, v. 111, p. 256-264, 2018.

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

ZHU, L.; CHEN, J.; TANG, X.; XIONG, Y. L. Reducing, Radical Scavenging, and Chelation Properties of in Vitro Digests of Alcalase-Treated Zein Hydrolysate. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, p. 2714-2721, 2008.

ZOU, T.; HE, T.; LI, H.; TANG, H.; XIA, E. The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins. **Molecules**, v. 21, n. 72, p. 1-14, 2016.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 através de cultivos submersos, usando penas de frango como principal substrato orgânico, representa abordagem interessante no contexto da destinação destes resíduos e diminuição dos custos de produção de enzimas.

A PPP ora caracterizada demonstrou ser biocatalisador efetivo na hidrólise de PIS vislumbrando a obtenção de hidrolisados que exibiram, *in vitro*, atividades antioxidantes, antidiabética e anti-hipertensiva.

Os hidrolisados demonstraram capacidade de capturar o radical ABTS (~69%), após 4 h de hidrólise, bem como, no mesmo período, exibiram 42% (HPIS4) e 39% (HPIS2) de captura do radical DPPH. Além disso, a hidrólise provocou aumentos significativos no poder redutor (0,083-0,200 Abs₇₀₀), porém limitados, em relação à PIS não hidrolisada (0,071 Abs₇₀₀). Já a quelação de Fe²⁺ demonstrou ser superior aos controles após 30, 60 e 120 min de hidrólise, entretanto, não foram observados padrões consistentes de aumento ou queda durante as hidrólises, portanto, houve pequena contribuição da hidrólise sobre este parâmetro.

A inibição da ACE foi incrementada pela hidrólise, atingindo valores máximos de 83,8-89,1% nos HPIS4 obtidos após 120-300 min de hidrólise. Já nos HPIS2, as máximas inibições (65,6-70,5%) foram mensuradas aos 240-300 min de hidrólise. Além disso, a hidrólise da PIS também ocasionou aumento da inibição da DPPIV, onde HPIS2 e HPIS4 demonstraram máxima inibição de 29,4-31,6% e 32,9-34,8% após 240-300 min de hidrólise, respectivamente.

Considerando a significância destas atividades biológicas no contexto da saúde humana e da ciência e tecnologia de alimentos, os hidrolisados produzidos são considerados promissores. Neste sentido, investigações acerca destes hidrolisados devem ser aprofundadas, especialmente no que se refere à identificação e caracterização de peptídeos, mas também quanto a aspectos de sua potencial toxicidade, dentre outros.

Finalmente, a capacidade da PPP em hidrolisar caseína merece ser investigada no futuro, tanto no intuito de obter hidrolisados bioativos, como também o uso da PPP como possível agente de coagulação.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, J.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Substitution of chemical dehairing by proteases from solid-state fermentation of hair wastes. **Journal of Cleaner Production**, v. 74, p. 191-198, 2014.
- AGYEI, D.; DANQUAH, M. K. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 272-277, 2011.
- AGRAWAL, D.; PATIDAR, P.; BANERJEE, T.; PATIL, S. Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1131–1136, 2005.
- AGUILAR, J. G. S.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253–262, 2018.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143-152, 2013.
- ASHA, B.; PALANISWAMY, M. Optimization of alkaline protease production by *Bacillus cereus* FT 1 isolated from soil. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 2, p. 119-127, 2018.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-31, 2014.
- BAGEWADI, Z. K.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z. Response surface methodology based optimization of keratinase production from *Trichoderma harzianum* isolate HZN12 using chicken feather waste and its application in dehairing of hide. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, p. 4828–4839, 2018.
- BANERJEE, G.; RAY, A. K. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 33, n. 2, p. 119-143, 2017.
- BECHAUX, J.; GATELLIER, P.; PAGE, J. P. L.; DRILLET, Y.; SANTE-LHOUTELLIER, V. A comprehensive review of bioactive peptides obtained from animal byproducts and their applications. **The Royal Society of Chemistry**, v.

10, p. 6244–6266, 2019.

BENLUVANKAR, V.; JEBAPRIYA, G. R.; GNANADOSS, J. J. protease production by *Penicillium* sp. LCJ 228 under solid state fermentation using groundnut oilcake as substrate. **International Journal of Life science & Pharma Research**, v. 5, n. 1, p. 12-19, 2015.

BHANGE, K.; CHATURVEDI, V.; BHATT, R. Ameliorating effects of chicken feathers in plant growth promotion activity by a keratinolytic strain of *Bacillus subtilis* PF1. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 3, p. 1-10, 2016.

BHUNIA, B.; BASAK, B.; BHATTACHARYA, P.; DEY, A. Process engineering studies to investigate the effect of temperature and pH on kinetic parameters of alkaline protease production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 1, p. 86-89, 2013.

BHUNIA, B.; BASAK, B.; DEY, A. A review on production of serine alkaline protease by *Bacillus* spp. **Journal Of Biochemical Technology**, v. 3, n. 4, p. 448-457, 2012.

BRANDELLI, A. Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, p. 105-116, 2008.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1735–1750, 2010.

BRANDELLI, A.; SALA, L.; KALIL, S. J. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. **Food Research International**, v. 73, cap. 20, p. 3–12, 2015.

BURGUESS, R. R. Protein Precipitation Techniques. In: BURGUESS, R. R.; DEUTSCHER, M. P. **Methods in Enzymology**, 2. ed. Oxford: Academic Press, 2009, v. 463, p. 331-342.

CASTRO, L.; FREEMAN, B. A. Reactive Oxygen Species in Human Health and Disease. **Nutrition**, v. 17, n. 2, p. 161-165, 2001.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Antioxidant activities and functional properties of soy protein isolate hydrolysates obtained using microbial proteases. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 317–328, 2014a.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Comparison and synergistic effects of intact proteins and their hydrolysates on the functional properties and antioxidant activities in a simultaneous process of enzymatic hydrolysis. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, p. 80-88, 2014b.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Synergistic actions of proteolytic enzymes for production of soy protein hydrolysates with antioxidant activities: An approach based on enzymes specificities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 694-702, 2015.

CHATTERJEE, C.; GLEDDIE, S.; XIAO, C. Soybean Bioactive Peptides and Their Functional Properties. **Nutrients**, v. 10, p. 1-16, 2018.

CHATURVEDI, V.; BHANGE, K.; BHATT, R.; VERMA, P. Production of kartinases using chicken feathers as substrate by a novel multifunctional strain of *Pseudomonas stutzeri* and its dehairing application. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 167-174, 2014.

CHELLAPPAN, S.; JASMIN, C.; BASHEER, S. M.; ELYAS, K. K.; BHAT, S. G.; CHANDRASEKARAN, M. Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 956–961, 2006.

CHEN, L.; CHEN, J.; YU, L.; WU, K. Improved emulsifying capabilities of hydrolysates of soy protein isolate pretreated with high pressure microfluidization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 1-8, 2016.

CONTESINI, F. J.; DE MELO, R. R.; SATO, H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 321-334, 2018.

CONTI, J. P.; VINDEROLA, G.; ESTEBAN, E. N. Characterization of a soy protein hydrolyzate for the development of a functional ingredient. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 896-904, 2019.

COSCUETA, E. R.; AMORIM, M. M.; VOSS, G. B.; NERLI, B. B.; PICÓ, G. A.; PINTADO, M. E. Bioactive properties of peptides obtained from Argentinian defatted soy flour protein by Corolase PP hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 198, p. 36–44, 2016.

DALIRI, E. B. M.; OFOSU, F. K.; CHELLIAH, R.; PARK, M. H.; KIM, J. H.; OH, D. H. Development of a Soy Protein Hydrolysate with an Antihypertensive

Effect. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1-12, 2019.

DALIRI, E. B. M.; OH, D. H.; LEE, B. H. Bioactive Peptides. **Foods**, v. 6, n. 32, p. 1-21, 2017.

DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. A current assessment on the production of bacterial keratinases. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 372-384, 2014.

DEFRONZO, R. A.; FERRANNINI, E.; GROOP, L.; HENRY, R. R.; HERMAN, W. H.; HOLST, J. J.; HU, F. B.; KAHN, C. R.; RAZ, I.; SHULMAN, G. I.; SIMONSON, D. C.; TESTA, M. A.; WEISS, R. Type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 1-22, 2015.

DE SOUZA, F. A. S.; SALES, A. E.; SILVA, P. E. C.; BEZERRA, R. P.; SILVA, G. M. M.; ARAÚJO, J. M.; TAKAKI, G. M. C.; PORTO, T. S.; TEIXEIRA, J. A. C.; PORTO, A. L. F. Optimization of Production, Biochemical Characterization and In Vitro Evaluation of the Therapeutic Potential of Fibrinolytic Enzymes from a New *Bacillus Amyloliquefaciens*. **Macromolecular Research**, v. 24, n. 7, p. 587-595, 2016.

FAKHFAKH-ZOUARI, N.; HADDAR, A.; HMIDET, N.; FRIKHA, F.; NASRI, M. Application of statistical experimental design for optimization of keratinases production by *Bacillus pumilus* A1 grown on chicken feather and some biochemical properties. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 617–626, 2010.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179–188, 2015.

FENG, Z.; CHEN, X.; LI, J.; REN, D. An alkaline protease from *Kocuria kristinae* F7: properties and characterization of its hydrolysates from soy protein. **European Food Research and Technology**, v. 236, p. 293-301, 2013.

FERRAREZE, P. A. G.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Purification and characterization of a keratinolytic protease produced by probiotic *Bacillus subtilis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 102–109, 2016.

GIRI, S. S.; SUKUMARAN, V.; SEN, S. S.; OVIYA, M.; BANU, B. N.; JENA, P. K. Purification and partial characterization of a detergent and oxidizing agent stable alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* VSG-4 of a tropical soil. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 455-461, 2011.

GUAN, H.; DIAO, X.; JIANG, F.; HAN, J.; KONG, B. The enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by Corolase PP under high hydrostatic pressure and its effect on bioactivity and characteristics of hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 245, p. 89-96, 2018.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; KHAN, S.; CHAUAN, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.60, p. 381–395, 2002b.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 15-32, 2002a.

GURUMALLESH, P.; ALAGU, K.; RAMAKRISHNAN, B.; MUTHUSAMY, S. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254–267, 2019.

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 Biochemistry**, v. 42, p. 791–797, 2007.

HARWOOD, C. R.; CRANENBURGH, R. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 73-79, 2008.

HONG, F.; MING, L.; YI, S.; ZHANXIA, L.; YONGQUAN, W.; CHI, L. The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs?. **Peptides**, v. 29, p. 1062-1071, 2008.

HORAX, R.; VALLECIOS, M. S.; HETTIARACHCHY, N.; OSORIO, L. F.; CHEN, P. Solubility, functional properties, ACE-I inhibitory and DPPH scavenging activities of Alcalase hydrolysed soy protein hydrolysates. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 196–204, 2017.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity **Assays**. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE – Estatística da Pesquisa Trimestral do Abate de Animais**. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9203->

pesquisas-trimestrais-do-abate-de-animais.html?=&t=series-historicas>. Acesso em: 10 set. 2019.

IWANIAK, A.; MINKIEWICZ, P.; DAREWICZ, M. Food-Originating ACE Inhibitors, Including Antihypertensive Peptides, as Preventive Food Components in Blood Pressure Reduction. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 114-134, 2014.

JARA, A. M. R.; LIGGIERI, C. S.; BRUNO, M. A. Preparation of soy protein hydrolysates with antioxidant activity by using peptidases from latex of *Maclura pomifera* fruits. **Food Chemistry**, v. 264, p. 326–333, 2018.

JASWAL, R. K.; KOCHER, G. S.; VIRK, M. S. Production of alkaline protease by *Bacillus circulans* using agricultural residues: A statistical approach. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 356-360, 2008.

JELLOULI, K.; GHORBEL-BELLAJ, O.; AYED, H. B.; MANNI, L.; AGREBI, R.; NASRI, M. Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1248–1256, 2011.

JIMÉNEZ-RUIZ, E.; BARCA, A. M. C.; SOTELO-MUNDO, R. R.; ARTEAGA-MACKINNEY, G. E.; VALENZUELA-MELENDZ, M.; PENA-RAMOS, E. A. Partial Characterization of Ultrafiltrated Soy Protein Hydrolysates with Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 8, p. 151-158, 2013.

KALAIARASI, K.; SUNITHA, P. U. Optimization of alkaline protease production from *Pseudomonas fluorescens* isolated from meat waste contaminated soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 24, p. 7035-7041, 2009.

KALAUKUMARI, S. S.; VENNILA, T.; MONIKA, V.; CHANDRARAJ, K.; GUNASEKARAN, P. Bioutilization of poultry feather for keratinase production and its application in leather industry. **Journal of Cleaner Production**, v. 208, p. 44-53, 2019.

KAMAL, S.; REHMAN, S.; IQBAL, H. M. N. Biotechnological Valorization of Proteases: From Hyperproduction to Industrial Exploitation—A Review. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 36, n. 2, p. 511-522, 2017.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; YADAV, S. K. Microbial proteases: Detection, production, and genetic improvement. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 262–276, 2011.

KEMPKA, A. P.; HONAISSER, T. C.; FAGUNDES, E.; PRESTES, R. C. Functional properties of soy protein isolate of crude and enzymatically hydrolysed at different times. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 6, p. 2229-2236, 2014.

KOTLAR, C.; PONCE, A.; ROURA, S. Characterization of a novel protease from *Bacillus cereus* and evaluation of an eco-friendly hydrolysis of a brewery byproduct. **Institute of Brewing & Distilling**, v. 121, p. 558-565, 2015.

LASEKAN, A.; BAKAR, F. A.; HASHIM, D. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. **Waste Management**, v. 33, p. 552-565, 2013.

LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T.; EGEA, M. B.; BRANDELLI, A.; KALIL, S. J. Simultaneous production of proteases and antioxidant compounds from agro-industrial by-products. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 210–216, 2016.

LI, W.; WANG, Y.; ZHAO, H.; HE, Z.; ZENG, M.; QIN, F.; CHEN, J. Improvement of emulsifying properties of soy protein through selective hydrolysis: Interfacial shear rheology of adsorption layer. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 453-460, 2016.

LIU, F.; CHEN, Z.; SHAO, J.; WANG, C.; ZHAN, C. Effect of Fermentation on the Peptide Content, Phenolics and Antioxidant Activity of Defatted Wheat Germ. **Food Bioscience**, v. 20, p. 141-148, 2017.

LIU, R.; CHENG, J.; WU, H. Discovery of Food-Derived Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitory Peptides: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 1-22, 2019.

LORENZO, J. M.; MUNEKATA, P. E. S.; GÓMEZ, B.; BARBA, F. J.; MORA, L.; PÉREZ-SANTAESCOLÁSTICA, C.; TOLDRÁ, F. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 79, p. 136–147, 2018.

MARTIN, M.; DEUSSEN, A. Effects of natural peptides from food proteins on angiotensin converting enzyme activity and hypertension. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1264-1283, 2017.

MCCARTHY, A. L.; O'CALLAGHAN, Y. C.; O'BRIEN, N. M. Protein Hydrolysates from Agricultural Crops—Bioactivity and Potential for Functional Food Development. **Agriculture**, v. 3, p. 112-130, 2013.

MEINLSCHMIDT, P.; SUSSMANN, D.; SCHWEIGGERT-WEISZ, U.; EISNER, P. Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties. **Food Science & Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 11-23, 2016.

MEZA-ESPINOZA, L.; SÁYAGO-AYERDI, S. G.; GARCÍA-MAGAÑA, M. L.; TOVAR-PÉREZ, E. G.; YAHIA, E. M.; VALLEJO-CORDOBA, B.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.; MONTALVO-GONZÁLEZ, E. Antioxidant capacity of egg, milk and soy protein hydrolysates and biopeptides produced by *Bromelia pinguin* and *Bromelia karatas*-derived proteases. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 30, n. 2, p. 122-130, 2018.

MIILS, K. T.; BUNDY, J. D.; KELLY, T. N.; REED, J. E.; KEARNEY, P. M.; REYNOLDS, K.; CHEN, J.; HE, J. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-based Studies from 90 Countries. **Circulation**, v. 134, n. 6, p. 441-450, 2016.

MOKASHE, N.; CHAUDHARI, B.; PATIL, U. Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 493-522, 2018.

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

NISHINARI, K.; FANG, Y.; GUO, S.; PHILLIPS, G. O. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 301-318, 2014.

NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk protein-derived dipeptides and hydrolysates. **Peptides**, v. 39, p. 157-163, 2013.

NWACHUKWU, I. D.; ALUKO, R. E. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 1-13, 2019.

Ó'FÁGÁIN, C.; CUMMINS, P. M.; O'CONNOR, B. F. Gel-Filtration Chromatography. In: WALLS D., LOUGHRAN S. (eds). **Protein Chromatography: Methods and Protocols**. Humana Press, 2011, v. 681, cap. 2, p. 25-33.

OLIVEIRA, C. F., COLETTI, D., CORREA, A. P. F., DAROIT, D. J., TONIOLO, R., CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Antioxidant activity and inhibition of meat lipid oxidation by soy protein hydrolysates obtained with a microbial protease. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 775-781, 2014.

OLIVEIRA, C. F.; CORREA, A. P. F.; COLETTI, D.; DAROIT, D. J.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. 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.

PARK, S. Y.; LEE, J.; BAEK, H.; LEE, H. G. Purification and characterization of antioxidant peptides from soy protein hydrolysate. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, p. 120-132, 2010.

POWER, O.; NONGONIERMA, A. B.; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R. J. Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, p. 34-46, 2014.

RAJPUT, R.; SHARMA, R.; GUPTA, R. Biochemical Characterization of a Thiol-Activated, Oxidation Stable Keratinase from *Bacillus pumilus* KS12. **Enzyme Research**, v. 3, p. 132-148, 2010.

RANAMUKHAARACHCHI, S. A.; PEIRIS, R. H.; MORESOLI, C. Fluorescence spectroscopy and principal component analysis of soy protein hydrolysate fractions and the potential to assess their antioxidant capacity characteristics. **Food Chemistry**, v. 217, p. 469-475, 2017.

RANAMUKHAARACHCHI, S.; MEISSNER, L.; MORESOLI, C. Production of antioxidant soy protein hydrolysates by sequential ultrafiltration and nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 429, p. 81-87, 2013.

RATHOD, M. G.; PATHAK, A. P. Optimized production, characterization and application of alkaline proteases from taxonomically assessed microbial isolates from Lonar soda lake, India. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 164–173, 2016.

RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B.; UMMALYMA, S. B.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; MADHAVAN, A.; REVELLO, S.; PANDEY, A. Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. **Food Technology & Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 16-30, 2018.

RAZZAQ, A.; SHAMSI, S.; ALI, A.; ALI, Q.; SAJJAD, M.; MALIK, A.; ASHRAF, M. Microbial Proteases Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 1-20, 2019.

REDDY, M. R.; REDDY, K. S.; CHOUHAN, Y. R.; BEE, H.; REDDY, G. Effective feather degradation and keratinase production by *Bacillus pumilus* GRK for its application as bio-detergent additive. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 254–263, 2017.

RIFFEL, A.; BRANELLI, A.; BELLATO, C. M.; SOUZA, G. H. M. F.; EBERLIN, M. N.; TAVARES, F. C. A. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 693–703, 2007.

ROBLET, C.; AMIOT, J.; LAVIGNE, C.; MARETTE, A.; LESSARD, M.; JEAN, J.; RAMASSAMY, C.; MORESOLI, C.; BAZINET, L. Screening of *in vitro* bioactivities of a soy protein hydrolysate separated by hollow fiber and spiral-wound ultrafiltration membranes. **Food Research International**, v. 46, p. 237–249, 2012.

RYAN, J. T.; ROSS, R. P.; BOLTON, D.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Bioactive Peptides from Muscle Sources: Meat and Fish. **Nutrients**, v. 3, p. 765-791, 2011.

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.

SÁNCHEZ, A.; VÁZQUEZ, A. Bioactive peptides: A review. **Food Quality and Safety**, v. 1, p. 29–46, 2017.

SANGHVI, G.; PATEL, H.; VAISHNAVA, D.; OZAA, T.; DAVE, G.; KUNJADIAC, P.; SHETHA, N. A novel alkaline keratinase from *Bacillus subtilis* DP1 with potential utility in cosmetic formulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 256–262, 2016.

SANJUKTA, S.; RAI, A. K. Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. **Trends in Food Science & Technology**, v. 50, p. 1-10, 2016.

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

SHARMA, M.; GAT, Y.; ARYA, S.; KUMAR, V.; PANGHAL, A.; KUMAR, A. A Review on Microbial Alkaline Protease: An Essential Tool for Various Industrial Approaches. **Industrial Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 69-78, 2019.

SHARMA, K. M.; KUMAR, R.; PANWAR, S.; KUMAR, A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, p. 115–126, 2017.

SILVA, R. R. Bacterial and Fungal Proteolytic Enzymes: Production, Catalysis and Potential Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 1, p. 1-19, 2017.

SINDHU, R.; SUPRABHA, G. N.; SHASHIDHAR, S. Optimization of process parameters for the production of alkaline protease from *Penicillium godlewskii* SBSS 25 and its application in detergent industry. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 9, p. 515-522, 2009.

SINGH, B. P.; VIJ, S.; HATI, S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v. 54, p. 171–179, 2014.

SINGH, B. P.; YADAV, D.; VIJ, S. Soybean Bioactive Molecules: Current Trend and Future Prospective. In: MÉRILLON, J. M.; RAMAWAT, K. G. (eds). **Bioactive Molecules in Food**, Reference Series in Phytochemistry, Springer, 2017, p. 1-29.

SINGH, P.; KUMAR, R.; SABAPATHY, S. N.; BAWA, A. S. Functional and Edible Uses of Soy Protein Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 7, p. 14-28, 2008.

SIVAPRAKASAM, S.; DHANDAPANI, B.; MAHADEVAN, S. optimization studies on production of a salt-tolerant protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain BC1 and its application on tannery saline wastewater treatment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1506-1515, 2011.

SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S. Recent developments

and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, p. 52-71, 2017.

SOHAIB, M.; ANJUM, F. M.; SAHAR, A.; ARSHAD, M. S.; RAHMAN, U. U.; IMRAN, A.; HUSSAIN, S. Antioxidant proteins and peptides to enhance the oxidative stability of meat and meat products: A comprehensive review. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 11, p. 2581-2593, 2017.

SPARKS, M. A.; CROWLEY, S. D.; GURLEY, S. B.; MIROTSOU, M.; COFFMAN, T. M. Classical Renin-Angiotensin System in Kidney Physiology. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 3, p. 1201-1228, 2014.

SUN, X. D. Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 2447–2459, 2011.

TAN, S. Y.; WONG, J. L. M.; SIM, Y. J.; WONG, S.; ELHASSAN, S. A. M.; TAN, S. H.; LIM, G. P. L.; TAY, N. W. R.; ANNAN, N. C.; BHATTAMISRA, S. K.; CANDASAMY, M. Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, p. 364-372, 2019.

TAVANO, O. L.; MURCIA, A. B.; SECUNDO, F.; LAFUENTE, R. F. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, p. 412-436, 2018.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146–161, 2013.

TIWARY, E.; GUPTA, R. Medium optimization for a novel 58 kDa dimeric keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15: Biochemical characterization and application in feather degradation and dehairing of hides. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6103–6110, 2010.

VERMA, A.; SINGH, H.; ANWAR, S.; CHATTOPADHYAY, A.; TIWARI, K. K.; KAUR, S.; DHILON, G. S. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 476-491, 2017.

VIDMAR, B.; VODOVNIK, M. Microbial Keratinases: Enzymes with Promising Biotechnological Applications. **Food Technology & Biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 312-328, 2018.

WANG, R.; ZHAO, H.; PAN, X.; ORFILA, C.; LU, W.; MA, Y. Preparation of bioactive peptides with antidiabetic, antihypertensive, and antioxidant activities and identification of α -glucosidase inhibitory peptides from soy protein. **Food Science & Nutrition**, v. 7, p. 1848-1856, 2019.

WINGFIELD, P. T. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. **Current Protocols in Protein Science**, p. 1-10, 2001.

ZANI, S. C. C.; WU, J.; CHAN, C. B. Egg and Soy-Derived Peptides and Hydrolysates: A Review of Their Physiological Actions against Diabetes and Obesity. **Nutrients**, v. 10, n. 5, p. 1-15, 2018.

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 Technology**, v. 101, p. 2084–2089, 2010.

ZHANG, Q.; TONG, X.; QI, B.; WANG, Z.; LI, Y.; SUI, X.; JIANG, L. Changes in antioxidant activity of Alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate under simulated gastrointestinal digestion and transepithelial transport. **Journal of Functional Foods**, v. 42, p. 298-305, 2018a.

ZHANG, Q.; TONG, X.; SUI, X.; WANG, Z.; QI, B.; LI, Y.; JIANG, L. Antioxidant activity and protective effects of Alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate in human intestinal epithelial Caco-2 cells. **Food Research International**, v. 111, p. 256-264, 2018b.

ZHANG, Y.; LIU, J.; LU, X.; ZHANG, H.; WANG, L.; GUO, X.; QI, X.; QIAN, H. Isolation and identification of an antioxidant peptide prepared from fermented peanut meal using *Bacillus subtilis* fermentation. **International Journal of Food Properties**, v. 17, n. 6, p. 1237-1253, 2014.

ZOU, T.; HE, T.; LI, H.; TANG, H.; XIA, E. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. **Molecules**, v. 21, n. 72, p. 1-14, 2016.