

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

BERNARDETE DA SILVA BERNARDO

**PRODUÇÃO DE PROTEASE POR *Bacillus* SP. CL18 EM CULTIVOS
SUBMERSOS E BIOATIVIDADES DE HIDROLISADOS PROTEICOS OBTIDOS
POR CONVERSÃO MICROBIANA E CATÁLISE ENZIMÁTICA**

CERRO LARGO

2022

BERNARDETE DA SILVA BERNARDO

**PRODUÇÃO DE PROTEASE POR *Bacillus* SP. CL18 EM CULTIVOS
SUBMERSOS E BIOATIVIDADES DE HIDROLISADOS PROTEICOS OBTIDOS
POR CONVERSÃO MICROBIANA E CATÁLISE ENZIMÁTICA**

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

2022

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Bernardo, Bernardete da Silva

Produção de protease por Bacillus sp. CL18 em cultivos submersos e bioatividades de hidrolisados proteicos obtidos por conversão microbiana e catálise enzimática / Bernardete da Silva Bernardo. -- 2022.

88 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, 2022.

1. Bioprocesso. 2. Enzima. 3. Biocatálise. 4. Hidrólise. I. Daroit, Daniel Joner, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

BERNARDETE DA SILVA BERNARDO

**PRODUÇÃO DE PROTEASE POR *Bacillus* SP. CL18 EM CULTIVOS
SUBMERSOS E BIOATIVIDADES DE HIDROLISADOS PROTEICOS
OBTIDOS POR CONVERSÃO MICROBIANA E CATÁLISE ENZIMÁTICA**

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: 30/08/2022

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Daniel Joner Daroit - UFFS



Profa. Dra. Suzymeire Baroni - UFFS



Profa. Dra. Nessana Dartora - UFFS

Dedico este trabalho aos meus pais Severina e José (*in memoriam*), a minha irmã Vilma (*in memoriam*), e ao meu filho Eliseo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e professor Dr. Daniel Joner Daroit, pela imensurável orientação, no qual confiou em mim a realização deste trabalho, pelos aprendizados, assistência e oportunidade de acompanhar e agregar conhecimentos adquiridos neste programa.

À coordenação, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa DS-CAPES.

Ao meu companheiro, Marcelo, pelo companheirismo, carinho e incentivo nesta caminhada.

À minha família, por todo incentivo e apoio incondicional.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia, especialmente à aluna da graduação Bruna Willig Kopplin por toda ajuda nos experimentos e amizade.

À Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), pela verba de custeio concedida a projeto do orientador, e por proporcionar o acesso à qualificação profissional.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Neste estudo, avaliou-se o efeito de diferentes tipos de substratos/cosubstratos orgânicos visando incrementar a produção de proteases extracelulares por *Bacillus* sp. CL18 em cultivos submersos, as bioatividades *in vitro* dos sobrenadantes recuperados de cultivos com a melhor combinação de substrato/cosubstrato, bem como a aplicação da protease obtida na produção de hidrolisados antioxidantes a partir de proteína isolada de soja (PIS). O uso de escamas de peixe moídas (FS) resultou na maior produção de proteases na concentração de 30 g/L (FS30). A adição de penas de frango moídas (MF) ocasionou aumento no rendimento de protease, particularmente na concentração de 5 g/L (FS5), sendo o pico de produção observado após quatro dias de cultivo. Observou-se elevação dos potenciais antioxidante, antidiabético e anti-hipertensivo durante cultivos da linhagem CL18 no meio otimizado (FS30+MF5), o que sugere a liberação de moléculas bioativas a partir das escamas e penas. A protease recuperada dos cultivos em meio otimizado foi capaz de hidrolisar a PIS, sendo observados incrementos na capacidade antioxidante dos hidrolisados obtidos, demonstrada pela captura de radicais, redução de Fe^{3+} e quelação de Fe^{2+} . Em suma, foi possível obter proteases e hidrolisados bioativos a partir da bioconversão de resíduos (FS e MF) por *Bacillus* sp. CL18. A protease produzida apresentou potencial para a hidrólise de uma proteína alimentar (PIS) com a consequente geração de hidrolisados com capacidades antioxidantes. Estudos subsequentes podem avaliar a capacidade da protease em hidrolisar outras proteínas (alimentares ou não), bem como avançar na identificação das moléculas bioativas obtidas pelos processos de bioconversão microbiana e catálise enzimática.

Palavras-chave: Bioprocesso. Enzima. Biocatálise. Hidrólise. Potencial bioativo.

ABSTRACT

In this study, the effect of different organic substrates/co-substrates to increase the production of extracellular proteases by *Bacillus* sp. CL18 in submerged cultures was evaluated, as well as the *in vitro* bioactivities of supernatants recovered from cultures with the best substrate/co-substrate combination, and the application of the obtained protease to produce antioxidant hydrolysates from soy protein isolate (PIS). Ground fish scales (FS) resulted in the highest protease production at a concentration of 30 g/L (FS30). The addition of milled chicken feathers (MF) caused an increase in the protease yield, particularly at the concentration of 5 g/L (FS5), with the production peak observed after 4 days of cultivation. An increase in antioxidant, antidiabetic and antihypertensive potentials was observed during cultivations with the CL18 strain in the optimized medium (FS30+MF5), which suggests the release of bioactive molecules from fish scales and feathers. The protease recovered from cultivations in optimized medium was able to hydrolyze PIS, with increased antioxidant capacity in the obtained hydrolysates, which was demonstrated by radical scavenging, reduction of Fe^{3+} and chelation of Fe^{2+} . In summary, it was possible to obtain proteases and bioactive hydrolysates from the bioconversion of wastes (FS and MF) by *Bacillus* sp. CL18. The produced protease showed potential for the hydrolysis of a food protein (PIS), with the consequent generation of hydrolysates with antioxidant capabilities. Subsequent studies can assess the protease's ability to hydrolyze other proteins (food or non-food), as well as advance towards the identification of bioactive molecules obtained through microbial bioconversion and enzymatic catalysis.

Keywords: Bioprocess. Enzyme. Biocatalysis. Hydrolysis. Bioactive potential.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Produção de proteases microbianas através de cultivos submersos usando substratos alternativos.....	21
Tabela 2 - Hidrolisados proteicos bioativos produzidos por bioconversão microbiana.	29
Tabela 3 - Proteases microbianas não-comerciais usadas na produção de hidrolisados proteicos antioxidantes a partir de proteínas do leite e da soja.....	32

LISTA DE FIGURAS

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO I

RESULTADOS II

- Figura 1 - Triagem de substratos para a produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18. Os substratos avaliados (10 g/L) foram: escamas de peixe (FS; ●), penas de frango (CF; ○), penas moídas (MF; ▼), farelo de soja (SM; □), peptona (PE; ■), caldo triptona de soja (TSB; □), caldo infusão cérebro-coração (BHI; □), proteína isolada do soro de queijo (WPI; ▲), farinha de ossos (BM; ○), caseína (CA; □), soro de queijo liofilizado (LW; □), bagaço de mandioca adicionado de 1 g/L NH₄Cl (CB+IN; □).....43
- Figura 2 - Produção de protease por *Bacillus* sp. CL18 em meio mineral contendo diferentes concentrações de escamas de peixe (FS). As concentrações de FS avaliadas foram: 10 (●), 20, (○), 30 (▼), 40 (△), e 50 g/L (■).....46
- Figura 3 - Produção de protease por *Bacillus* sp. CL18 em meio mineral contendo 30 g/L de escamas de peixe (FS30) e suplementado com diferentes cosubstratos. Os cosubstratos avaliados (1 g/L) foram: penas moídas (MF; ▲), farelo de soja (SM; △), peptona (PE; ○), caseína (CA; □), soro de queijo liofilizado (LW; ◇), bagaço de mandioca (CB; ◆), proteína isolada de soja (SPI; ▼), glicose (■), NH₄Cl (▽), e (NH₄)₂SO₄ (●). Soro de queijo líquido (CW; ○) foi testado em substituição à água destilada (50 mL) no meio FS30. A produção de protease no meio FS30, sem suplementação (●), foi adicionada à figura para comparação.....48
- Figura 4 - Produção de protease por *Bacillus* sp. CL18 em meio mineral contendo 30 g/L de escamas de peixe (FS30) suplementado com diferentes concentrações de penas moídas (MF). As concentrações de MF avaliadas foram: 1,0 (●), 2,5, (○), 5,0 (▼), 7,5 (△), 10,0 (■), 15,0 (□), e 20,0 g/L (◆).50
- Figura 5 - Concentração de proteínas solúveis (a), Captura do radical ABTS (b), e quelação de Fe²⁺ (c) avaliados em hidrolisados coletados durante cultivos de *Bacillus* sp. CL18 nos meios FS30 (●) e FS30+MF5 (○).52

Figura 6 - Inibição *in vitro* da atividade da enzima dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) (a) e da enzima conversora de angiotensina-I (ACE) (b) por hidrolisados coletados durante cultivos de *Bacillus* sp. CL18 nos meios FS30 (●) e FS30+MF5 (○).54

CAPÍTULO II

RESULTADOS II

Figura 1 - Estabilidade térmica da protease bruta de *Bacillus* sp. CL18, após pré-incubação a 50 °C (círculos), 52,5 °C (quadrados) e 55 °C (losangos), na ausência (símbolos pretos) ou presença de 5 mM Ca²⁺ (símbolos brancos)66

Figura 2 - Concentração de proteínas solúveis de hidrolisados de PIS, em função do tempo de incubação com a protease bruta de *Bacillus* sp. CL18.....68

Figura 3 - Atividades antioxidantes de hidrolisados de PIS avaliadas através da captura dos radicais ABTS (a) e DPPH (b), quelação de Fe²⁺ (c) e redução de Fe³⁺ (d).....69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

Abs: Absorbância

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

ACE: Enzima conversora de angiotensina-I

BM: Farinha de osso

BHI: Caldo infusão cérebro-coração

Ca^{2+} : Íons cálcio

CaCl_2 : Cloreto de Cálcio

CA: caseína

CB: Bagaço de mandioca

CF: Penas de frango

CW: soro de queijo líquido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

DPP IV: Dipeptidil peptidase IV

Fe^{2+} : Íons ferrosos

Fe^{3+} : Íons férricos

FeSO_4 : Sulfato de ferro (II)

FS: Escamas de peixe moídas

HCl: Ácido clorídrico

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

IN: Nitrogênio inorgânico

K_2HPO_4 : Fosfato dipotássico

K_2SO_4 : Sulfato de potássio

KDa: Kilodalton

KH_2PO_4 : Fosfato monopotássico

LW: soro de leite liofilizado

MF: Penas moídas

NaCl: Cloreto de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

NH_4Cl : Cloreto de amônio

PCA: Ágar Padrão para Contagem

pH: Potencial hidrogeniônico
PE: Peptona
PIS: Proteína isolada da soja
rpm: Rotação por minuto
SmF: Fermentação submersa
SM: Farelo de soja
SPI: Proteína isolada de soja
SSF: Fermentação em estado sólido
TCA: Ácido tricloroacético
Tris: Tris hidroximetil aminometano
TSB: Caldo triptona de soja
WPI: Proteína isolada de soro de leite

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS.....	17
1.1.1 Objetivo geral	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS MICROBIANAS	18
2.1.1 Produção de proteases microbianas	19
2.1.2 Utilização de proteases microbianas.....	24
2.2 HIDROLISADOS PROTEICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS	26
2.2.1 Hidrolisados proteicos bioativos produzidos por processos microbianos ou enzimáticos	28
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
CAPÍTULO I.....	35
3.1 RESULTADOS I	35
CAPÍTULO II.....	63
3.2 RESULTADOS II	63
4 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

As proteases, conhecidas também como peptidases, são importantes enzimas, como afirmam Kumar e Takagi (1999), sendo elementos primordiais para a existência de todos os seres vivos, englobando assim representantes dos domínios Eukarya, Archea e Bacteria. São essenciais para o desenvolvimento e diferenciação celular, metabolismo, dentre outros processos fisiológicos, mantendo a homeostase no meio em que estão inseridas (KOHLMANN et al., 1991; RAY; GHOSH; RINGØ, 2012).

Estas enzimas, particularmente aquelas produzidas por microrganismos, vêm sendo usadas no setor biotecnológico, como catalisadores em indústrias alimentícias, rações, detergentes, couros, dentre outras e as demandas por proteases crescem em nível exponencial para obtenção destes biocatalisadores. A produtividade das proteases microbianas é influenciada pelo estado nutricional dos meios de cultura, e o manejo da composição destes meios caracteriza um avanço importante objetivando maior produção destas enzimas (GIMENES; SILVEIRA; TAMBOURGI, 2021; SHARMA et al., 2017).

Inúmeros insumos comerciais são disponibilizados para a produção de proteases microbianas, estudos demonstram que resíduos agroindustriais são uma possibilidade em larga escala e baixo custo para se obter essas enzimas. Dentre os subprodutos usados como substratos para a obtenção de proteases microbianas podemos destacar os rejeitos da indústria de carne, pescado, leite e grãos. O uso desses subprodutos possibilita o manejo e destinação adequados para estes resíduos (BEN REBAH; MILED, 2013; DAROIT; BRANDELLI, 2014; KAMAL; REHMAN; IQBAL, 2016; KASANA; SALWAN; YADAV, 2011). Ademais, a bioconversão microbiana pode resultar em outros produtos além das enzimas, como é o caso de hidrolisados proteicos bioativos (CALLEGARO; BRANDELLI; DAROIT, 2019).

Proteases microbianas vêm sendo investigadas na hidrólise de diferentes proteínas e neste contexto, a hidrólise controlada de proteínas, essencialmente aquelas advindas do leite e da soja, é estudada com a finalidade de aprimorar atividades biológicas. Essas atividades são inerentes aos peptídeos liberados das proteínas pela ação enzimática e são conhecidos por peptídeos bioativos (CHATTERJEE et al., 2018). Neste sentido, uma detalhada atenção é posta sobre

os hidrolisados e peptídeos antioxidantes, por causa da sua abrangência no sentido nutricional e saúde humana (POWER; JAKEMAN; FITZGERALD, 2013; SINGH; VIJ; HATI, 2014).

Na perspectiva biotecnológica, a proteína precursora e a protease utilizada na hidrólise determinam os peptídeos liberados e, as bioatividades dos hidrolisados. A maioria das pesquisas utiliza proteases comerciais para obter hidrolisados com maiores atividades biológicas. Neste seguimento, a investigação das variedades microbianas é uma alternativa para a obtenção de proteases, com a capacidade de produzir hidrolisados proteicos com capacidades bioativas (AGUILAR; SATO, 2018; DAROIT; BRANDELLI, 2021).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Otimizar a produção de protease pela bactéria *Bacillus* sp. CL 18 aplicando-a para a obtenção de hidrolisados antioxidantes a partir de proteína de soja (PIS).

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar diferentes substratos visando à otimização da produção de protease por *Bacillus* sp. CL 18;
- Investigar, *in vitro*, as atividades biológicas em sobrenadantes de cultivos otimizados;
- Utilizar a protease na produção de hidrolisados de PIS;
- Caracterizar os hidrolisados de PIS quanto à concentração de proteínas solúveis e atividades antioxidantes *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS MICROBIANAS

Proteases são uma classe de enzimas cuja função é a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas, liberando aminoácidos e peptídeos. A classificação das proteases se dá de diferentes maneiras, mas usualmente, podem ser segregadas em dois grupos, o primeiro grupo abrange as exopeptidases, que produzem pequenos peptídeos ou até mesmos aminoácidos iniciando o seu processo de hidrólise a partir das extremidades amino-terminal (N) e/ou carboxi-terminal (C) e o segundo é o das endopeptidases, capazes de gerar peptídeos maiores a partir da clivagem da proteína alvo em regiões distantes das extremidades amino- e/ou carboxi-terminais (BARBOSA, 2011). Ademais, as proteases podem ser classificadas quanto à especificidade por substratos, sítio ativo e ação catalítica (SUMANTHA, 2006).

Estas enzimas são produzidas por todos os seres vivos e, a sua relevância abrange um largo campo para as suas aplicações biotecnológicas, que ocorre nos mais diversos segmentos nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, couro, detergentes, cosméticos, dentre outros, representando cerca de 60% das vendas de enzimas a nível mundial (SINGH; BAJAJ, 2017; KASANA et al., 2011).

Por questões de viabilidade e agilidade, há maior utilização das proteases microbianas, em relação às proteases de origem animal e vegetal, visto que os microorganismos têm maior agilidade na produção de enzimas em meios de cultivo específicos, em condições controláveis, originando um caldo rico em proteases com menor custo, que são amplamente utilizadas por sua imensa diversidade bioquímica e catalítica (DANILOVA; SHARIPOVA, 2020; SHARMA et al., 2017).

Dessa forma, a vasta biodiversidade microbiana é amplamente destacada no sentido de se obter microrganismos que possam fornecer proteases específicas para a bioprospecção e dentre os microrganismos produtores de proteases, temos os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* (DE SOUZA et al., 2015; GIMENES; SILVEIRA; TAMBOURGI, 2021). Entretanto, a maior produção de proteases é oriunda de bactérias, como aquelas dos gêneros *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Micrococcus* e *Arthrobacter* (BANERJEE; RAY, 2017; SHARMA et al., 2019).

Ao longo dos anos, as bactérias do gênero *Bacillus* são amplamente utilizadas para aquisição de proteases, sendo que este gênero bacteriano vem sendo muito investigado pela sua capacidade de produzir proteases neutras e alcalinas, assim classificadas conforme o pH de atuação e são estudadas por fornecer enormes quantidades de enzimas extracelulares; o que torna viável o processo de recuperação destes biocatalisadores a partir dos cultivos microbianos (CONTESINI; MELO; SATO, 2018; VAN DIJL; HECKER, 2013).

2.1.1 Produção de proteases microbianas

Inúmeras condições podem interferir na produção de proteases por microrganismos proteolíticos. Os meios produtivos, contidos em meios líquidos (cultivos submersos; SmF) ou em meios sólidos (cultivos em estado sólido; SSF), afetam o desempenho microbiano e a produção de enzimas. Cerca de 90% das técnicas industriais para obtenção de proteases bacterianas são em meio SmF (ARYA et al., 2021). A influência dos SmF está interligado com um controle de padrões dentro dos processos, como temperatura, pH, homogeneização e aeração, com curto tempo de cultivo geralmente essencial para se obter os produtos, e igualmente uma maior facilidade de separação de biomassa e recuperação de enzimas (SHARMA et al., 2017).

Os SmF sobressaem frente aos SSF pela razão das proteases comerciais serem predominantemente bacterianas, visto que as bactérias geralmente necessitam de grande quantidade de água (água livre) para o seu metabolismo. Em compensação, os SSF estão mais relacionados à obtenção de bioprodutos produzidos por fungos, que requerem menores quantidades de água livre (KAMAL; REHMAN; IQBAL, 2017).

Alguns critérios são importantes para que haja a produção de proteases microbianas, podendo ser destacados a temperatura, pH, aeração, agitação e o tempo de cultivo, já que estes fatores influenciam as atividades microbianas. De igual maneira, a constituição do meio de cultura, por influenciar no crescimento bacteriano e na formação de metabólitos, realiza uma importante influência na produção de enzimas (AGUILAR; SATO, 2018). Neste sentido, ressalta-se que as condições favoráveis para o crescimento de determinado microrganismo, não

significam uma maior produção de proteases (GIMENES; SILVEIRA; TAMBOURGI, 2021; KASANA; SALWAN; YADAV, 2011).

Observando a natureza quimioheterotrófica dos microrganismos usados na obtenção de proteases, fontes orgânicas de carbono e energia são fundamentais, substratos como glicose (CHAUDHURI; PAUL; PAL, 2021; KUMURA; ISHIDO; SHIMAZAKI, 2011; RAKSHIT et al., 2021), galactose (DEVI; JHA, 2020), lactose (BHATTACHERJEE et al., 2021), sacarose (SULEIMAN et al., 2020) e amido (MORABANDZA et al., 2021) são habitualmente utilizados. Outro fator importante é o nitrogênio, que também é um importante constituinte de proteínas, enzimas e ácidos nucleicos, fontes de nitrogênio como ureia (BHATTACHERJEE et al., 2021), peptonas (DEVI; JHA, 2020; THU et al., 2020), extrato de levedura (CHAUDHURI; PAUL; PAL, 2021), caseína (RAKSHIT et al., 2021; SULEIMAN et al., 2020), proteína isolada de soja (OLIVEIRA et al., 2016) e proteína isolada de soro de queijo (KUMURA; ISHIDO; SHIMAZAKI, 2011), tem demonstrado a eficiência na produção de proteases microbianas.

Entretanto, a busca por recursos nutricionais adequados para a secreção de proteases é incessante, visto que para cada tipo bacteriano há especificidades nutricionais para o seu crescimento. Assim, diversas hipóteses devem ser observadas quanto à repressão ou indução da síntese de proteases (KASANA; SALWAN; YADAV, 2011), desta forma, encontrar substratos que possam suprir as demandas microbianas para a produção das enzimas ainda é o objeto de interesse constante em pesquisas (CONTESINI; MELO; SATO, 2018).

Mediante estas circunstâncias, resíduos orgânicos de atividades agroindustriais são fontes promissoras e de baixo custo, para a produção dessas enzimas (KASANA; SALWAN; YADAV, 2011). Substratos de origem vegetal, como farelos de soja, milho, trigo e algodão, bagaço de mandioca, melaço e o licor de maceração de milho, são uma alternativa viável de meios de cultura para se obter proteases (Tabela 1).

Diversas categorias de resíduos agroindustriais de origem animal vêm sendo investigadas, destacam-se o soro de queijo (PANESAR; KENNEDY, 2012), e penas de frango e as farinhas delas obtidas, também são promissoras fontes de produção de proteases por microrganismos queratinolíticos (DAROIT; BRANDELLI, 2014). Além disso, a indústria pesqueira gera enorme quantidade de resíduos, oriundos de crustáceos, moluscos e peixes (BEN REBAH; MILED, 2013).

Tabela 1 - Produção de proteases microbianas através de cultivos submersos usando substratos alternativos.

Microrganismo produtor	Composição do meio de cultura		Condições de cultivo	Referência
	Substrato(s) alternativo(s)	Outros ingredientes*		
<i>Alcaligenes faecalis</i> SK10	Pó de cascas de camarão e caranguejo (20 g/L)	Extrato de levedura (5 g/L)	35 °C; 120 rpm; pH inicial 7,0; 2 dias	Pal et al. (2021)
<i>Aspergillus niger</i> AB ₁₀₀	Pó de escamas de peixe (71 g/L)	Glicose (50 g/L), Ureia (25 g/L)	28 °C; estático; pH inicial 4,0; 14 dias	Basu; Banik; Das (2008)
<i>Aspergillus tamaris</i> MTCC 5152	Farelo de algodão (10 g/L)	Glicose (5 g/L)	28 °C; 350 rpm; pH inicial 6,5; 64 h	Dhandapani; Mahadevan; Muthiah (2020)
<i>Bacillus altitudinis</i> GVC11	Escamas de peixe (5 g/L)	Sulfato de amônio (1 g/L)	37 °C; 200 rpm; pH inicial 10,0; 2 dias	Harikrishna et al. (2017)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 35 M	Farelo de soja (35 g/L), Farelo de milho (6,25 g/L)	Cloreto de amônio (10 g/L)	37 °C; 200 rpm; pH inicial 7,2; 5 dias	Xie et al. (2022)
<i>Bacillus cereus</i> HMRSC30	Pó de cascas de camarão (30 g/L)	Sulfato de amônio (3 g/L)	30 °C; 150 rpm; pH inicial 6,5; 7 dias	Cahyaningtyas et al. (2021)
<i>Bacillus cereus</i> BG1	Subprodutos do processamento de sépia (10 g/L), Água residuária de indústria de pescado (diluição 1:5)	Maltose (10 g/L)	37 °C; 200 rpm; 2 dias	Souissi et al. (2008)
<i>Bacillus cereus</i> BG1	Farinha de cabeças e víscera de sardinha (20 g/L)	–	37 °C; 200 rpm; pH 8,0; 2 dias	Sellami-Kamoun et al. (2011)
<i>Bacillus cereus</i>	Resíduos de carne do processamento de atum (30 g/L)	Extrato de levedura (1 g/L), Galactose (15 g/L); Triton X-100 (0,8%, v/v)	32 °C; agitação recíproca; pH inicial 7,0; 2 dias	Esakkiraj et al. (2009)
<i>Bacillus cereus</i> SUK	Escamas de peixe (9.4 g/L), Melão (2.4 g/L)	–	37 °C; 120 rpm; pH inicial 7,0; 67 h	Bhagwat et al. (2018)
<i>Bacillus clausii</i>	Soro de queijo líquido	–	25 °C; 50 rpm; pH inicial 6,2; 3 dias	Rochín-Medina et al. (2018)
<i>Bacillus cytotoxicus</i> OII-15	Penas de frango (10 g/L)	–	50 °C; 150 rpm; pH inicial 6,0; 1 dia	Cavello; Bezus; Cavalitto (2021)
<i>Bacillus cytotoxicus</i> LT-1	Penas de frango (10 g/L)	–	50 °C; 150 rpm; pH inicial 6,0; 33 h	
<i>Bacillus licheniformis</i> BL312	Farelo de trigo (30 g/L), Licor de maceração de milho (5 g/L)	Glicose (5 g/L)	37 °C; 210 rpm; pH inicial 6,6; 2 dias	Zhang et al. (2019)
<i>Bacillus licheniformis</i> ALW1	Melão (80 g/L), Farelo de trigo (50 g/L)	Sulfato de amônio (4,5 g/L)	37 °C; 280 rpm; pH inicial 8,0; 7 dias	Emran; Ismail; Hashem (2020)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Farinha de penas (25 g/L)	–	40 °C; 200 rpm; pH inicial 10,0; 2 dias	Alahyaribeik et al. (2020)

Continua

Tabela 1 - Continuação

Microrganismo produtor	Composição do meio de cultura		Condições de cultivo	Referência
	Substrato(s) alternativo(s)	Outros ingredientes*		
<i>Bacillus paralicheniformis</i> MKU3	Penas de frango (10 g/L)	–	37 °C; 150 rpm; pH inicial 8,0; 3 dias	Kalaikumari et al. (2019)
<i>Bacillus pumilus</i> MTCC 7514	Farinha de peixe (10 g/L)	–	30 °C; 120 rpm; pH inicial 7,0; 2 dias	Gupta et al. (2012)
<i>Bacillus</i> sp. APCMST-RS3	Pó de cascas de camarão (30 g/L), Pó de concha de ostra (10 g/L)	–	50 °C; 150 rpm; 2 dias	Maruthiah et al. (2015)
<i>Bacillus</i> sp. CL33A	Farinha de penas (30 g/L), Bagaço de mandioca (5 g/L)	–	30 °C; 125 rpm; pH inicial 7,5; 4 dias	Clerici; Lermen; Daroit (2021)
<i>Bacillus</i> sp. CSK2	Penas de frango (7,5 g/L)	Maltose (2 g/L)	30 °C; 200 rpm; pH inicial 5,0; 2 dias	Nnolim; Nwodo (2020)
<i>Bacillus</i> sp. NKSP-7	Farinha de penas (10 g/L)	Lactose (15 g/L), Peptona (30 g/L), Extrato de carne (2 g/L), Extrato de levedura (4 g/L)	37-40 °C; 150 rpm; pH inicial 7,0-7,5; 1 dia	Akram; Haq; Jabbar (2020)
<i>Bacillus subtilis</i>	Farinha de cabeças e víscera de sardinha (10 g/L)	–	37 °C; 150 rpm	Ellouz et al. (2001)
<i>Bacillus subtilis</i> AU-2	Farelo de soja (10 g/L)	Glicose (7,5 g/L)	37 °C; 60 rpm; pH inicial 7,0; 2 dias	Patel et al. (2019)
<i>Bacillus subtilis</i> FTC02PR1	Farinha de penas (10 g/L)	–	37 °C; 125 rpm; 4 dias	Ferrareze et al. (2016)
<i>Bacillus subtilis</i> MTCC 2616	Soro de queijo líquido	Extrato de levedura (10 g/L)	30 °C; 150 rpm; 51 h	Sahoo et al. (2020)
<i>Bacillus subtilis</i> SCK6	Farelos de milho (49 g/L) e soja (17 g/L), Licor maceração de milho (8 g/L)	Amido solúvel (28 g/L), Extrato de levedura (10 g/L)	35 °C; 180 rpm; pH inicial 7,0; 3 dias	He et al. (2021)
<i>Bacillus tequilensis</i>	Pele residual de abatedouro (300 g/L)	–	37 °C; 200 rpm; 32 h	Kaur; Azmi (2013)
<i>Bacillus tequilensis</i> WS14	Farinha de ossos (10 g/L)	–	37 °C; 120 rpm; 2 dias	Baqueiro-Peña et al. (2019)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Soro de queijo (50 g/L),	Leite desnatado (10 g/L)	37 °C; 150 rpm; pH inicial 7,0; 3 dias	El-Gayar; Essa; Abada (2020)
<i>Bacillus velezensis</i> P11	Proteínas residuais da produção de proteína isolada de peixe (10 g/L)	–	37 °C; 150 rpm; pH inicial 7,0; 3 dias	Martins et al. (2011)
<i>Geobacillus</i> sp. SBS-4S	Farelo de trigo (50 g/L)	Triptona (10 g/L), Extrato de levedura (5 g/L)	60 °C; agitação orbital; pH inicial 7,0; 18 h	Ahmad et al. (2020)
<i>Haloferax lucentensis</i> GUBF-2 MG076078	Resíduos de camarão (50 g/L)	–	42 °C; 120 rpm; pH inicial 6,0; 3 dias	Gaonkar; Furtado (2021)
<i>Myrothecium verrucaria</i> CCT 1886	Penas moídas (10 g/L), Bagaço de mandioca (10 g/L)	Extrato de levedura (1 g/L)	28 °C; 125 rpm; pH inicial 5,7; 4 dias	Gioppo et al. (2009)

Continua

Tabela 1 - Continuação

Microrganismo produtor	Composição do meio de cultura		Condições de cultivo	Referência
	Substrato(s) alternativo(s)	Outros ingredientes*		
<i>Ochrobactrum intermedium</i> NKIS 1	Penas de frango (5 g/L)	Extrato de levedura (1 g/L)	40 °C; 200 rpm; pH inicial 7,0; 4 dias	Sharma; Kango (2021)
<i>Paenibacillus elgii</i> TKU051	Pó de gládios de lula (10 g/L)	–	37 °C; 150 rpm; pH inicial 7,2; 4 dias	Lee et al. (2021)
<i>Paenibacillus mucilaginosus</i> TKU032	Pó de cabeças da camarão (15 g/L)	–	37 °C; 150 rpm; 3 dias	Doan et al. (2020a)
<i>Paracoccus saliphilus</i> APCMST-CS5	Pó de cascas de camarão (19,6 g/L), Pó de sardinha (12,5 g/L)	Caseína (1 g/L), Extrato de levedura (1 g/L), Tween 40 (0,1 g/L)	50 °C; 125 rpm; pH inicial 9,0; 2 dias	Maruthiah; Palavesam (2017)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MN7	Farinha de sardinha (10 g/L)	–	37 °C; 150 rpm; pH inicial 8,0; 1 dia	Triki-Ellouz et al. (2003)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> YK17	Penas de frango (20 g/L)	Glicose (10 g/L), Nitrato de amônio (1 g/L), Extrato de carne (0,2 g/L)	37 °C; 150 rpm; pH inicial 7,5; 3 dias	Moonnee et al. (2021)
<i>Pseudomonas geniculata</i> KC2	Penas de ave (10 g/L)	Extrato de levedura (0,1 g/L)	15 °C; estático; pH inicial 8,5; 2 dias	Sengupta et al. (2018)
<i>Streptomyces thermolineatus</i>	Resíduos do processamento de peixes (150 g/L)	Sulfato de amônio (2 g/L), Frutose (0,5 g/L)	45 °C; pH inicial 8,0; 4 dias	Suganthi; Ramani (2016)
<i>Thermoactinomyces</i> sp. YT06	Penas de frango (10 g/L)	Sacarose (10 g/L), Nitrato de Amônio (4 g/L)	60 °C; 180 rpm; pH inicial 10,0; 2 dias	Wang et al. (2017)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Subprodutos do processamento de sépia (10 g/L), Água residuária de indústria de pescado (diluição 1:10)	–	37 °C; 200 rpm; 1 dia	Souissi et al. (2008)
<i>Virgibacillus halodenitrificans</i> RSK CAS1	Pó de cascas de camarão (15,3 g/L)	Caseína (5,3 g/L)	40 °C; 125 rpm; pH inicial 9,0; 2 dias	Sathishkumar; Ananthan; Raghunathan (2015)
<i>Vogesella</i> sp.7307-1	Pó de escamas de peixe (5 g/L)	Triptona (0,16 g/L), Extrato de levedura (0,27 g/L)	37 °C; 150 rpm; pH inicial 7,5; 4 dias	Pan et al. (2010)

* Componentes inorgânicos dos meios de cultura, com exceção de fontes de nitrogênio, não são apresentados.

A aquisição de bioprodutos através da bioconversão microbiana torna-se uma alternativa econômica para o manejo, reciclagem e valorização de biomassas residuais e essas características consistem a base do conceito de biorrefinaria que, em última análise, visa à sustentabilidade agroindustrial (CALLEGARO; BRANDELLI; DAROIT, 2019).

2.1.2 Utilização de proteases microbianas

As enzimas utilizadas no meio industrial são, particularmente, as amilases, celulases, fitases, lipases, quitinases e proteases. Estas últimas ganham relevância em aplicações industriais específicas nos âmbitos biotecnológico e farmacêutico (GUPTA et al., 2002; MAAREL et al., 2002; RAJAGOPALAN; KRISHNAN, 2008; PADMAPRIYA; WILLIAMS, 2012).

A alta procura por uma protease que tenha uma maior versatilidade do seu uso em detergentes faz com que haja uma busca contínua, na escolha de bactérias que corresponda por uma produção permanente de proteases adequadas, tendo em vista a perspectiva ambiental, que contribuem para a sustentabilidade do meio ambiente (BANERJEE, 2017).

Uma das principais aplicações das enzimas proteolíticas se dá na indústria de detergentes, como componentes de detergentes usados na lavagem de roupas e louças. As proteases, ao atuarem na quebra de proteínas, facilitam o processo de remoção de sujidades e manchas de natureza proteica, com menor tempo de imersão e agitação (KAMAL; REHMAN; IQBAL, 2017; SOLANKI et al., 2021), bem como usadas em soluções de limpeza para lentes de contato (BARZKAR, 2020).

A aplicação das proteases ocorre em diversas etapas do manejo do couro, como por exemplo, na substituição de agentes químicos que podem acarretar em efluentes tóxicos de difícil tratamento para a indústria coureira. Alternativamente, o uso de proteases possibilita a remoção facilitada dos pelos, diminuindo a necessidade de uso de agentes químicos agressivos e reduzindo a carga poluente dos efluentes (MATKAWALA et al., 2021; MOKASHE; CHAUDHARI; PATIL, 2018; SHARMA et al., 2019).

As indústrias têxteis também vêm utilizando enzimas proteolíticas para o tratamento da lã, da qual as fibras são constituídas por proteínas (queratinas), e o uso de proteases queratinotíticas favorece a hidrofiliabilidade, capacidade de absorção

de pigmentos no processo de tingimento, e eleva a resistência ao encolhimento (SRIVASTAVA et al., 2020).

Já no caso da seda que é uma fibra constituída por duas proteínas, a fibroína e a sericina, o interesse da indústria têxtil reside na fibroína, que confere aos fios de seda suas propriedades conhecidas e altamente valorizadas. A sericina tem propriedades adesivas e cimentantes, formando um envelope ao redor da fibroína e, assim, deve ser removida das fibras brutas da seda, em um processo denominado de degomagem. Métodos enzimáticos de degomagem, utilizando proteases microbianas capazes de hidrolisar a sericina, obtiveram excelentes resultados no que se refere aos processos tradicionais de degomagem que utilizam soluções alcalinas e sabões, que além de poluição, podem resultar em danos à fibra, perda da resistência e do brilho da seda (SINGH; BAJAJ, 2017).

Em outra perspectiva, sabe-se que de 1,5 a 2% de prata é utilizada em filmes de raio-X, e outras porcentagens em filme de fotografia e ressonância magnética, nos quais a prata fica aderida em uma camada gelatinosa. A reciclagem requer a combustão do filme, oxidação da prata metálica, e a extração da camada de gelatina-prata, da qual há a geração de grandes quantidades de poluentes (SINGHAL et al., 2012). Enzimas proteolíticas podem ser usadas como alternativas na recuperação da prata ao hidrolisar a gelatina contida nas emulsões com prata (KAMAL; REHMAN; IQBAL, 2017).

Nos ramos de cosméticos e médico/farmacêutico, proteases vêm sendo utilizadas na depilação, remoção de calos, exfoliação da pele (DE MENEZES et al., 2021), tratamento da acne (HASSAN et al., 2020), hidrólise de príons (SINGH; BAJAJ, 2017), e degradação de coágulos (trombos) sanguíneos (BARZKAR, 2020).

A imensa gama de aplicações das proteases microbianas também se enquadra na ciência e tecnologia de alimentos (RAVEENDRAN et al., 2018), usadas, por exemplo, como agentes para o amaciamento de carnes, através da hidrólise controlada de proteínas miofibrilares e do tecido conjuntivo (BEKHIT et al., 2014). Proteases microbianas são usadas na produção de queijos, particularmente na etapa de coagulação do leite, em substituição ao coalho de origem animal. Neste processo, as proteases, ao hidrolisar ligações peptídicas, desestabilizam as micelas de caseína no leite, promovendo sua agregação e conseqüente coagulação (KOCABAŞ; LYNE; USTUNOL, 2021).

Em produtos de panificação, o uso de proteases está associado à hidrólise das proteínas do glúten, o que afeta positivamente propriedades reológicas da massa, como elasticidade, viscosidade e plasticidade, também influenciando em propriedades sensoriais, como a textura dos produtos (DAHIYA et al., 2020; POURMOHAMMADI; ABEDI, 2021). Proteases são também aplicadas na modulação das propriedades funcionais de outras proteínas alimentares. Características como a solubilidade, capacidade de gelificação, formação de espumas e emulsões, podem ser otimizadas a partir da hidrólise controlada de proteínas (TAVANO, 2013).

A aplicação de enzimas proteolíticas também é relevante visando reduzir o potencial alergênico de proteínas, como aquelas do leite e ovos, da soja e de outras leguminosas, bem como do glúten, nos produtos à base de trigo e outros cereais. Nestes casos, as proteases devem atuar hidrolisando o determinante antigênico, ou seja, a porção da proteína que dá origem à resposta imunológica que caracteriza as alergias alimentares (TAVANO et al., 2018).

A hidrólise de proteínas alimentares pode beneficiar a digestibilidade e aumentar seu valor nutricional (SINGH; BAJAJ, 2017), peptídeos liberados durante a hidrólise de proteínas podem exercer atividades biológicas relevantes e dentre as bioatividades estão os efeitos antioxidantes, anti-hipertensivos, antidiabéticos e antimicrobianos. Desta forma, somada à importância nutricional, os hidrolisados proteicos assumem significância na saúde humana (AGUILAR; SATO, 2018; CHALAMIAH; YU; WU, 2018; MANZOOR; SINGH; GANI, 2022; TAVANO et al., 2018).

2.2 HIDROLISADOS PROTEICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Diferentes proteínas, de origem animal e vegetal, vêm sendo descritas como fontes potenciais de hidrolisados e peptídeos bioativos (DAROIT; BRANDELLI, 2021; KEHINDE; SHARMA, 2020; LORENZO et al., 2018; SÁNCHEZ; VÁZQUEZ, 2017). A produção de hidrolisados proteicos pode ser realizada através de métodos biológicos ou químicos, os primeiros englobam o uso de processos microbianos ou enzimáticos (HOU et al., 2017), já a hidrólise química, ácida ou alcalina, embora represente uma estratégia de baixo custo, apresenta diversas limitações, como dificuldades no controle do processo, perda de propriedades nutricionais, destruição

de aminoácidos, e a geração de produtos tóxicos, fazendo com que seja geralmente relegada na produção de hidrolisados bioativos (ULUG; JAHANDIDEH; WU, 2021).

Interesse vem sendo especialmente focado na obtenção de hidrolisados e peptídeos com atividade antioxidante. Isso se deve ao reconhecimento do potencial deletério que o estresse oxidativo representa para sistemas biológicos que é caracterizado pelo desequilíbrio metabólico entre os processos de produção de radicais livres e os mecanismos antioxidantes naturais do organismo. Nesta situação, os radicais livres (como os radicais peroxila, hidroxila e superóxido) em excesso atuam danificando lipídios, proteínas e DNA e com o passar o tempo, o estresse oxidativo compromete funções celulares e aumenta a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças, como diabetes, câncer, aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (POWER; JAKEMAN; FITZGERALD, 2013). Vários autores ressaltam as propriedades benéficas dos peptídeos bioativos nas respostas celulares para a inibição do estresse oxidante (PHILANTO, 2006).

Diversos estudos buscam uma maneira de reduzir a oxidação dos produtos da indústria de alimentos, e assim prevenir a oxidação enzimática (lipoxigenase) e não enzimática (peroxidação) de ácidos graxos, aumentando a qualidade alimentícia, que é de grande interesse econômico e industrial (BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015). Reações de oxidação, especialmente de lipídios, são indesejáveis em alimentos, visto que afetam negativamente a vida de prateleira, o sabor, odor, a textura, e podendo originar compostos tóxicos (DOMÍNGUEZ et al., 2019). Portanto, hidrolisados proteicos e peptídeos são postulados como antioxidantes naturais que podem auxiliar no combate aos inconvenientes associados às reações oxidativas nos contextos tanto fisiológico quanto da qualidade dos alimentos (SARMADI; ISMAIL, 2010; SINGH; SINGH; GANDHI, 2018).

A atividade antioxidante de peptídeos contidos nos hidrolisados está relacionada, por exemplo, à habilidade de inativar radicais, através da transferência de hidrogênio e doação de elétrons, à inibição da peroxidação lipídica, e à capacidade de quelar íons metálicos pró-oxidantes. Estas propriedades são determinadas pelo tamanho e massa do peptídeo, pelos tipos de aminoácidos constituintes, e também pela sequência dos aminoácidos no peptídeo. Usualmente, peptídeos antioxidantes possuem de dois a 16 aminoácidos e massa molecular menor que 3 kDa. A presença de aminoácidos hidrofóbicos (valina, leucina),

aromáticos (fenilalanina, triptofano, tirosina) e básicos (histidina) está relacionada a maiores potenciais antioxidantes (MANZOOOR; SINGH; GANI, 2022; NWACHUKWU; ALUKO, 2019; POWER; JAKEMAN; FITZGERALD, 2013).

As atividades anti-hipertensiva e antidiabética de hidrolisados proteicos também vêm sendo descritas. A inibição da atividade da enzima conversora de angiotensina-I (ACE) é o usual ensaio escolhido para detectar, *in vitro*, o potencial anti-hipertensivo de hidrolisados proteicos. Isto se deve à relevância da ACE no controle da pressão sanguínea e, com isso, sua relação direta com a hipertensão, condição associada a doenças crônicas e degenerativas (MARTIN; DEUSSEN, 2019; TOLDRÁ et al., 2020).

Quanto à atividade antidiabética de hidrolisados proteicos, pode ser avaliada, *in vitro*, através da capacidade de inibição da enzima dipeptidil peptidase IV (DPP IV), visto que hidrolisa hormônios responsáveis pelo controle glicêmico após a ingestão de alimentos (LACROIX; LI-CHAN, 2016).

2.2.1 Hidrolisados proteicos bioativos produzidos por processos microbianos ou enzimáticos

Nos processos microbianos, usualmente referidos como fermentações, substratos proteicos são usados para o cultivo de microrganismos que, durante seu crescimento, secretam as enzimas proteolíticas que irão hidrolisar o substrato (NASRI et al., 2022).

Neste sentido, além das próprias proteases, os hidrolisados proteicos representam produtos adicionais que podem ser recuperados a partir dos cultivos microbianos. Esta abordagem vem recebendo crescente atenção, sendo que diversos estudos avaliam o potencial bioativo de hidrolisados produzidos via hidrólise microbiana. Assim como para a produção de enzimas proteolíticas, biomassas residuais vêm sendo exploradas como substratos para este propósito (Tabela 2).

Tabela 2 - Hidrolisados proteicos bioativos produzidos por bioconversão microbiana.

Microrganismo	Substrato(s)	Condições de cultivo	Bioatividade <i>in vitro</i> dos hidrolisados proteicos	Referência
<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i> M1V	Subprodutos do processamento de camarão (25 g/L)	45 °C; 200 rpm; pH inicial 7,4; 2 dias	Antioxidante: Captura de radicais (ABTS, DPPH, inibição da oxidação do β -caroteno, proteção contra danos ao DNA induzidos por radicais hidroxila) Anti-hipertensiva: Inibição da ACE Antimelanogênese: Inibição da tirosinase Antidiabética: Inibição de α -amilase	Mechri et al. (2020)
<i>Aspergillus oryzae</i> OAY1	Pele de peixe (pregado) (250 g/L)	30 °C; 180 rpm; 7 dias	Antioxidante: Captura de radicais (DPPH), quelação de Fe^{2+} , redução de Fe^{3+}	Fang et al. (2017)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KB1	Penas de frango (10 g/L)	40 °C; 150 rpm; pH inicial 9,0; 7 dias	Antioxidante: Captura de radicais (DPPH)	Prajapati; Koirala; Anal (2021)
<i>Bacillus anthracis</i> e <i>Bacillus fusiformis</i>	Água residuária de perca-do-Nilo	45 °C; 160 rpm; 2,5 dias	Antioxidante: Captura de radicais (ABTS, DPPH), quelação de Fe^{2+} Antimicrobiana: <i>Vibrio vulnificus</i>	Mhina; Jung; Kim (2020)
<i>Bacillus cereus</i> SUK	Escamas de peixe (9,4 g/L), Melaço (2,4 g/L)	37 °C; 120 rpm; pH inicial 7,0; 2,8 dias	Antimicrobiana: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i>	Bhagwat et al. (2018)
<i>Bacillus clausii</i>	Soro de queijo	25 °C; 50 rpm; pH inicial 6,2; 3-4 dias	Antioxidante: Captura de radicais (ABTS, DPPH) Antimicrobiana	Rochín-Medina et al. (2018)
<i>Bacillus natto</i>	Saia do manto de <i>Chlamys farreri</i> (44,4 g/L)	39,9 °C; 38,4 h	Anti-hipertensiva: Inibição da ACE	Gao et al. (2021)
<i>Lactobacillus</i> spp.	Subproduto da extração de amido de arroz (75 g/L)	37 °C; 150 rpm; 3 dias	Antioxidante: Captura de radicais (ABTS) Anti-hipertensiva: Inibição da ACE Antimelanogênese: Inibição da tirosinase	Babini et al. (2020)
<i>Bacillus</i> sp. CL14	Farinha de penas (10 g/L)	30 °C; 125 rpm; pH inicial 7,5; 7-12 dias	Antioxidante: Captura de radicais (ABTS, DPPH), quelação de Fe^{2+} , redução de Fe^{3+} Antidiabética: Inibição de DPP IV	Bernardo et al. (2019)
<i>Bacillus</i> sp. CL33A	Farinha de penas (10 g/L)	30 °C; 125 rpm; pH inicial 7,5; 3-5 dias	Antioxidante: Captura de radicais (ABTS, DPPH), quelação de Fe^{2+} , redução de Fe^{3+} Antidiabética: Inibição de DPP IV	Bernardo et al. (2019)
<i>Bacillus subtilis</i> 05	Farinha de penas (30 g/L), Bagaço de mandioca (5 g/L)	30 °C; 125 rpm; pH inicial 7,5; 4 dias	Antioxidante: Captura de radicais (ABTS), quelação de Fe^{2+} , redução de Fe^{3+}	Clerici; Lermen; Daroit (2021)
	Soro que queijo concentrado	50 °C; 150 rpm; 8 h	Antioxidante: Captura de radicais (ABTS) Anti-hipertensiva: Inibição da ACE	Pérez et al. (2019)

Continua

Tabela 2 - Continuação

Microrganismo	Substrato(s)	Condições de cultivo	Bioatividade <i>in vitro</i> dos hidrolisados proteicos	Referência
<i>Bacillus subtilis</i> A26	Farinha de carne de sardinha (30 g/L)	37 °C; 200 rpm; pH inicial 8,0; 1 dia	Antioxidante: Captura de radicais (DPPH, inibição da oxidação do β -caroteno, proteção contra danos ao DNA induzidos por radicais hidroxila), redução de Fe^{3+} Antimicrobiana: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i>	Jemil et al. (2014)
<i>Haloferax lucentensis</i> GUBF-2 MG076078	Torta de coco; Torta de amendoim; Farelo de arroz; Resíduo de camarão; Escamas de peixe; Cascas de caranguejo; Penas de frango (moídos, 50 g/L)	42 °C; 120 rpm; pH inicial 6,0; 3 dias	Antioxidante: Captura de radicais (DPPH)	Gaonkar; Furtado (2021)
<i>Lactobacillus fermentum</i> SM 605	Camarões (<i>Acetes chinensis</i>) moídos (100 g/L), glicose (20 g/L), acetato de sódio (5 g/L), citrato de amônio (2 g/L)	38,1 °C; pH inicial 6,12; 24,2 h	Anti-hipertensiva: Inibição da ACE	Wang et al. (2008)
<i>Ochrobactrum intermedium</i> NKIS 1	Farinha de penas (5 g/L), extrato de levedura (1 g/L)	40 °C; 200 rpm; pH inicial pH 7,0; 4 dias	Antioxidante: Captura de radicais (DPPH)	Sharma; Kango (2021)
<i>Pedobacter</i> sp. 3.14.7	Penas de frango (30 g/L)	20 °C; 150 rpm; pH inicial 6,0; 8 dias	Antioxidante: Captura de radicais (ABTS, óxido nítrico), redução de Fe^{3+}	Bezus et al. (2021)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (cinco linhagens)	Subprodutos do processamento de caranguejo (250 g/L)	21-25 °C; 140 rpm; 3 dias	Antioxidante: Captura de radicais (ABTS, DPPH)	Zou et al. (2021)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A2	Subprodutos do processamento de camarão (50 g/L), Glicose (50 g/L)	30 °C; 200 rpm; pH inicial 7,0; 5 dias	Antioxidante: Captura de radicais (DPPH, inibição da oxidação do β -caroteno), quelação de Fe^{2+} , redução de Fe^{3+}	Ghorbel-Bellaaj et al. (2018)

Abreviações: ABTS: radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico; DPPH: radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; ACE: enzima conversora de angiotensina-I. DPP IV: dipeptidil peptidase IV.

Quanto à hidrólise enzimática, apesar do custo relativamente elevado em comparação aos processos químicos e microbianos, esta abordagem pode ser vantajosa devido à especificidade das reações catalisadas, maior controle e menor tempo de processo. De fato, processos enzimáticos representam a principal estratégia na obtenção de hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos e nesta perspectiva, tanto os substratos proteicos quanto as proteases empregadas na hidrólise têm efeito sobre os peptídeos gerados e, portanto, sobre as potenciais bioatividades dos hidrolisados proteicos (DALIRI; OH; LEE, 2017; RYAN et al., 2011; TOLDRÁ et al., 2020). Muitos peptídeos investigados demonstraram ação antioxidantes, imunomoduladora, antimicrobiana, antitumoral, antiúlcera, dentre outros (CORREA, et al., 2011).

Enzimas proteolíticas comerciais são amplamente investigadas nos processos hidrolíticos. Neste cenário, podem ser citadas proteases de origem animal, como tripsina, pepsina e quimotripsina, e aquelas de origem vegetal, como papaína e bromelina (LORENZO et al., 2018; MANZOOR; SINGH; GANI, 2022). No entanto, sendo as preparações comerciais obtidas de microorganismos mais utilizadas, como é o caso da Alcalase (*Bacillus licheniformis*), Protamex (*Bacillus* sp.), Flavourzyme (*Aspergillus oryzae*), Neutrase (*B. amyloliquefaciens*), Thermolysin (*B. stearothermophilus*), e Corolase 7089 (*B. subtilis*) (TOLDRÁ et al., 2020).

Resultados promissores também estão sendo reportados quanto ao uso de proteases microbianas não-comerciais na produção de hidrolisados com capacidade antioxidante a partir de proteínas alimentares, particularmente aquelas do leite e, em menor proporção, também da soja (Tabela 3). Hidrolisados antioxidantes também vêm sendo obtidos a partir de outras proteínas usando proteases não-comerciais de *Bacillus* spp. (EMBIRIEKAH et al., 2018; HE et al., 2006; HWANG et al., 2016; MARUTHIAH et al., 2015), *Enterococcus faecalis* DM19 (DJELLOULI et al., 2021), *Halobacillus andaensis* (DELGADO-GARCÍA et al., 2019), *Paenibacillus* sp. TKU052 (DOAN et al., 2020b), e *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 (CHEN et al., 2017).

Assim, considerando a diversidade de microrganismos proteolíticos, o uso de proteases alternativas àquelas comercialmente disponíveis representa uma interessante abordagem visando expandir a compreensão do potencial dos hidrolisados proteicos como fonte de peptídeos bioativos (AGUILAR; SATO, 2018; DAROIT; BRANDELLI, 2014; KOCABAŞ; LYNE; USTUNOL, 2021).

Tabela 3 - Proteases microbianas não-comerciais usadas na produção de hidrolisados proteicos antioxidantes a partir de proteínas do leite e da soja.

Protease		Substrato(s) proteico(s)	Condições de hidrólise	Mecanismo antioxidante dos hidrolisados obtidos	Referência
Fonte microbiana	Purificação				
<i>Acremonium</i> sp. L1-4B	Sim	Caseinato bovino (10 g/L)	Relação enzima:substrato (E/S): 1/68 (v/v); 30 °C; pH inicial 6,5;	Captura de radicais (ABTS), quelação de Fe ²⁺ e Cu ²⁺	Nascimento et al., 2021)
		Caseinato caprino (10 g/L)	150 rpm; 2-24 h	Captura de radicais (ABTS, DPPH), quelação de Fe ²⁺ e Cu ²⁺	
<i>Aspergillus oryzae</i> LBA01	Parcial	Proteína de soro de leite (80 g/L)	E/S: 875 U/g; 55 °C; pH inicial 5,0; 1-4 h	Captura de radicais (DPPH, peroxil)	Castro; Sato (2014a)
		Proteína isolada de soja (100 g/L)	E/S: 200-400 U/g; 55 °C; pH inicial 5,0; 4 h		Castro; Sato (2014b)
<i>Aspergillus sojae</i> ATCC 20235	Não	Caseína (10 g/L)	E/S: 40 U/g; 48 °C; pH inicial 6,4; 50 rpm; 1 h	Captura de radicais (DPPH)	Ortiz et al. (2016)
<i>Bacillus</i> sp. CL14	Não	Proteína isolada de soro de leite (5 g/L)	E/S: 12.960 U/g; 55 °C; pH inicial 9,0; agitação recíproca; 1- 3 h	Captura de radicais (ABTS), quelação de Fe ²⁺	Lermen et al. (2022)
<i>Bacillus</i> sp. MTCC 9558	Sim	Caseína (> 3 kDa) (0,6 g/L) β-lactoglobulina (> 3 kDa) (0,6 g/L) Farinha de soja (> 3 kDa) (0,6 g/L)	Atividade da enzima: 5,1 U/mL; 45 °C; 2-6 h	Captura de radicais (DPPH)	Prasad; Nair (2021)
<i>Bacillus</i> sp. P7	Parcial	Caseinato ovino (10 g/L)	E/S: 3.200 U/g; 45 °C; pH inicial 8,0; agitação recíproca; 1-2 h	Captura de radicais (ABTS, DPPH), quelação de Fe ²⁺ , redução de Fe ³⁺	Corrêa et al. (2011)
		Caseinato bovino (10 g/L)	E/S: 140 U/g; 45 °C; pH inicial 8,0; 1-6 h	Captura de radicais (ABTS), quelação de Fe ²⁺ , redução de Fe ³⁺	Hidalgo et al. (2015)
		Soro de leite ovino (liofilizado) (10 g/L)	E/S: 2.114 U/g; 45 °C; pH inicial 8,0; agitação recíproca; 1-6 h		Corrêa et al. (2014)
<i>Bacillus</i> sp. P45	Parcial	Caseinato ovino (5 g/L)	E/S: 568 U/g; 45 °C; pH inicial 8,0; 3-4 h	Captura de radicais (ABTS)	Daroit et al. (2012)
		Caseinato bovino (5 g/L)	E/S: 160 U/g; 45 °C; pH inicial 8,0; 1-7 h	Captura de radicais (DPPH)	Hidalgo et al. (2012)

Continua

Tabela 3 - Continuação

Protease		Substrato(s) proteico(s)	Condições de hidrólise	Mecanismo antioxidante dos hidrolisados obtidos	Referência
Fonte microbiana	Purificação				
<i>Chryseobacterium polytrichastri</i> ERM1:04	Sim	Proteína isolada de soja (10 g/L)	E/S: 1.000 U/g; 37 °C; pH inicial 8,0; 0,25-8 h	Captura de radicais (ABTS, DPPH), quelação de Fe ²⁺ , redução de Fe ³⁺	Mukhia; Kumar; Kumar (2021)
<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	Parcial	Proteína isolada de soja	E/S: 1.633-8.000 U/g; 45 °C; pH inicial 8,0; 150 rpm; 1-6 h		Oliveira et al. (2014, 2015)
<i>Eupenicillium javanicum</i>	Sim	Caseína bovina (50 g/L) Soro de leite bovino (>10 kDa; liofilizado) (50 g/L)	E/S: 1/20 (m/m); 45 °C; 200 rpm; 3-12 h	Captura de radicais (DPPH), quelação de Fe ²⁺	Hamin Neto; Rosa; Cabral (2019)
<i>Myceliophthora thermophila</i>	Sim	Caseína bovina (50 g/L) Soro de leite bovino (>10 kDa; liofilizado) (50 g/L)			
<i>Paenibacillus elgii</i> TKU051	Não	Proteína de soja (10 g/L)	E/S: 1/1 (v/v); 60 °C; pH 6,0-7,0; 4 h	Captura de radicais (DPPH)	Lee et al. (2021)
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Parcial	Caseína bovina (10 g/L)	E/S: 1/1 (m/m); enzima imobilizada; 37 °C; pH inicial 9,0; 0,25-2,3 h	Captura de radicais (ABTS, H ₂ O ₂)	Duarte Neto et al. (2017)
<i>Pleurotus eryngii</i>	Não	Caseína bovina (1,5 g/L)	E/S: 138 U/g; 37 °C; pH inicial 6,5; com agitação; 0,5-24 h	Captura de radicais (ABTS), redução de Fe ³⁺	Perna et al. (2020)
<i>Sporisorium reilianum</i>	Sim	Proteína concentrada de soro de leite (WPC)	E/S: 7,6-20,7 U/g; um/mL; 37 °C; pH inicial 3,0; 0,5-1,5 h		Tovar-Jiménez et al. (2021)
<i>Sporobolomyces roseus</i> LOCK 1119	Sim	Caseína bovina (10 g/L)	E/S: 1/5 (m/m); 30 °C; pH inicial 4,0; 6-48 h	Captura de radicais (DPPH)	Białkowska et al. (2018)
<i>Streptomyces gedanensis</i> IFO 13427	Não	Caseína (50 g/L) Proteína de soja (50 g/L)	E/S: 1/2,5 (m/m); 55 °C; pH inicial 8,5; com agitação; 6 h	Captura de radicais (DPPH), redução de Fe ³⁺	Rahulan et al. (2012)

Abreviações: DPPH: radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; ABTS: radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolona)-6-ácido sulfônico.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho estão apresentados nos Capítulos I e II, relacionados às subseções 3.1 e 3.2, respectivamente.

A subseção 3.1 corresponde ao artigo científico intitulado “Bioconversão de escamas de peixe e penas de frango por *Bacillus* sp. CL18 para a produção de proteases e hidrolisados bioativos”, que trata da otimização da produção de proteases pelo isolado bacteriano usando diferentes substratos e cosubstratos na composição de meios de cultura, bem como descreve potenciais antioxidantes, antidiabético e anti-hipertensivo, avaliados *in vitro* nos sobrenadantes dos cultivos realizados no meio otimizado. Este artigo foi submetido ao periódico *Waste and Biomass Valorization*, e está na fase de avaliação por pares.

Na subseção 3.2 são apresentados resultados complementares, não contemplados do referido artigo, onde investigou-se a estabilidade térmica da protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 e seu uso na produção de hidrolisados proteicos antioxidantes a partir de proteína isolada de soja.

CAPÍTULO I

3.1 RESULTADOS I

Bioconversão de escamas de peixe e penas de frango por *Bacillus* sp. CL18 para a produção de proteases e hidrolisados bioativos

RESUMO

Este estudo explorou diversos substratos/cosubstratos para otimizar a produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18, e examinou as bioatividades no meio otimizado. A produção de protease foi avaliada usando a abordagem de um-fator-por-vez. Doze substratos (10 g/L) foram inicialmente testados, e o melhor foi avaliado em 10-50 g/L. Posteriormente, 12 cosubstratos foram adicionados, e então o melhor foi investigado (1-20 g/L). A atividade proteolítica foi mensurada nos sobrenadantes de cultivos nos dias (d) 0-6, usando azocaseína. Ensaio de bioatividade *in vitro* envolveram habilidades de eliminação de radicais e quelação de Fe^{2+} , e a inibição de dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) e da enzima conversora de angiotensina-I (ACE). Escamas de peixe moídas (FS; 10 g/L) resultaram na maior produção de proteases (360 U/mL; d4), que foi 8-92% superior do que os outros substratos. Com FS, o maior rendimento de protease (496 U/mL; d4) foi observado em 30 g/L (FS30). Entre os cosubstratos (1 g/L) adicionados ao FS30, as penas moídas (MF) foram os melhores (670 U/mL; d4). Finalmente, a maior produção de protease (780 U/mL; d4) foi detectada com 5 g/L MF (MF5). Após a otimização (FS30+MF5), a produção foi de 216% daquela com 10 g/L FS. Em relação às atividades antioxidantes, as capacidades de sequestro de radicais e quelação de Fe^{2+} em FS30+MF5 aumentaram de 31,7% e 3,0% (d0) para 77,2% e 55,3% (d4), respectivamente. As atividades *in vitro* de inibição de DPP-IV (antidiabética) e da ACE (anti-hipertensiva) atingiram 65,0-73,0% (d1-4) e 71,2% (d4), em comparação com 8,3% e 28,7% (d0), respectivamente. Em conclusão, um meio de baixo custo à base de resíduos foi desenvolvido para a produção de proteases. A coprodução de hidrolisados bioativos contribui ainda mais para a valorização de escamas e penas, representando um bioprocessamento promissor do ponto de vista da economia circular.

Palavras-chave: Resíduos orgânicos. Bioprocessamento. Cultivo submerso. Enzima proteolítica. Hidrolisados. Bioatividades.

ABSTRACT

This study explored diverse substrates/co-substrates to optimize protease production by *Bacillus* sp. CL18, and examined bioactivities in optimized medium. Protease production was assessed using a one-variable-at-a-time approach. Twelve substrates (10 g/L) were initially tested, and the best one was evaluated at 10-50 g/L. Subsequently, 12 co-substrates were added, and then the best one was investigated (1-20 g/L). Proteolytic activity was measured in culture supernatants at days (d) 0-6, using azocasein. *In vitro* bioactivity assays involved radical-scavenging and Fe²⁺-chelating abilities, and the inhibition of dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) and angiotensin-I converting enzyme (ACE). Ground fish scales (FS; 10 g/L) yielded increased protease production (360 U/mL; d4), which was 8-92% higher than other substrates. With FS, higher protease yield (496 U/mL; d4) was observed at 30 g/L (FS30). Among the co-substrates (1 g/L) added to FS30, milled feathers (MF) were the best one (670 U/mL; d4). Finally, highest protease production (780 U/mL; d4) was detected with 5 g/L MF (MF5). After optimization (FS30+MF5), production was 216% of that with 10 g/L FS. Regarding antioxidant activities, radical-scavenging and Fe²⁺-chelating capacities in FS30+MF5 increased from 31.7% and 3.0% (d0) to 77.2% and 55.3% (d4), respectively. *In vitro* DPP-IV-inhibiting (antidiabetic) and ACE-inhibiting (antihypertensive) activities reached 65.0-73.0% (d1-4) and 71.2% (d4), as compared to 8.3% and 28.7% (d0), respectively. In conclusion, a low-cost waste-based medium was developed for protease production. Co-production of bioactive hydrolysates further contributes to the valorization of fish scales and feathers, representing a promising bioprocess from a circular economy perspective.

Keywords: Organic waste. Bioprocessing. Submerged cultivation. Proteolytic enzyme. Hydrolysates. Bioactivities.

3.1.1 INTRODUÇÃO

Proteases bacterianas e fúngicas estão consolidadas como importantes biocatalisadores nas indústrias de detergentes, couros e alimentos. As proteases obtidas a partir de microrganismos respondem por aproximadamente 40% das

vendas globais de enzimas. As aplicações de enzimas proteolíticas estão geralmente associadas à sua capacidade de hidrolisar ligações peptídicas e, neste contexto, a diversidade de características bioquímicas e catalíticas das proteases microbianas oferece a oportunidade de inovações em produtos e processos baseados em enzimas (DANILOVA; SHARIPOVA, 2020; SINGH; BAJAJ, 2017a). A crescente demanda comercial por proteases indica a necessidade de se obter maiores quantidades dessas enzimas. Ao mesmo tempo, os meios de cultura representam cerca de 50% do custo total da produção industrial de proteases, principalmente devido ao uso de fontes dispendiosas de carbono e nitrogênio para o crescimento microbiano (GAONKAR; FURTADO, 2021).

A seleção dos substratos fornecidos aos microrganismos está entre as estratégias relevantes para aumentar a produção de proteases. Diferentes microrganismos geralmente requerem condições nutricionais distintas para maiores rendimentos de proteases, e a triagem de substratos para o crescimento microbiano oferece ainda a possibilidade de reduzir os custos de produção (KASANA; SALWAN; YADAV, 2011). Nesse sentido, resíduos abundantes da cadeia produtiva da carne, como penas de frango (AKRAM; HAQ; JABBAR, 2020), e aqueles provenientes de indústrias de processamento de crustáceos e peixes (GAONKAR; FURTADO, 2021), têm sido investigados como substratos para a produção de proteases microbianas. O mesmo se aplica aos subprodutos da indústria de laticínios, principalmente o soro de queijo (SAHOO et al., 2020). Entre os subprodutos de baixo custo gerados a partir do processamento de matérias-primas vegetais, farelos de soja, milho e trigo, melaço e licor de maceração de milho são explorados como componentes de meios alternativos para produção de proteases (EMRAN; ISMAIL; HASHEM, 2020; HE et al., 2021).

As enzimas estão entre os bioprodutos mais interessantes que podem ser obtidos a partir da conversão microbiana de biomassas residuais, integrando o conceito de economia circular na perspectiva do desenvolvimento sustentável (ROJAS; ZAPATA; RUIZ-TIRADO, 2022). Além disso, o escopo dos bioprocessos destinados à obtenção de proteases microbianas vem se expandindo, uma vez que produtos adicionais podem ser recuperados a partir da conversão de resíduos e subprodutos agroalimentares. Entre estes estão os hidrolisados proteicos, misturas complexas de aminoácidos e peptídeos resultantes da ação de proteases sobre os materiais proteicos fornecidos aos microrganismos como substratos de crescimento.

Cada vez mais atenção é dedicada a esses hidrolisados, pois eles podem apresentar bioatividades interessantes, que estão relacionadas aos peptídeos neles contidos (CALLEGARO; BRANDELLI; DAROIT, 2019). Por exemplo, hidrolisados e peptídeos obtidos do processamento microbiano de diversos materiais residuais gerados pelo setor de alimentos são relatados como possuidores de potenciais antioxidantes, antimicrobianos, antidiabéticos e anti-hipertensivos (CAVELLO; BEZUS; CAVALITTO, 2021; GHORBEL-BELLAJ et al., 2018; MARTÍ-QUIJAL et al., 2020; MOAYEDI et al., 2017; RAMÍREZ; PINEDA-HIDALGO; ROCHÍN-MEDINA, 2021; ZOU et al., 2021).

Nesse sentido, *Bacillus* sp. CL18 é uma bactéria capaz de produzir proteases extracelulares durante cultivos submersos com penas de frango como substratos, e os sobrenadantes recuperados dos cultivos apresentaram potenciais bioativos (CALLEGARO; WELTER; DAROIT, 2018; SOBUCKI; RAMOS; DAROIT, 2017). No entanto, essas investigações anteriores se concentraram apenas na capacidade de degradação de penas desta linhagem bacteriana. Considerando o cenário acima mencionado, buscamos explorar ainda mais o potencial proteolítico de *Bacillus* sp. CL18. Portanto, vários substratos e suplementos, desde aqueles comerciais até resíduos agroalimentares, foram avaliados para aumentar os rendimentos de proteases. Complementarmente, os sobrenadantes de cultura do meio otimizado foram examinados quanto às suas bioatividades *in vitro*.

3.1.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.2.1 MICRORGANISMO E PREPARO DO INÓCULO

Bacillus sp. CL18, previamente isolada do solo, usado como linhagem produtora de protease, foi mantida em placas de Ágar Padrão para Contagem (PCA) a 4 °C. Para preparar o inóculo, o isolado foi cultivado em placas de PCA a 30 °C por 24 h. A biomassa bacteriana foi coletada e adicionada a solução salina estéril (8,5 g/L NaCl). Essas suspensões bacterianas, ajustadas para ~1,0 unidade de absorvância (Abs) a 600 nm, foram usadas para inocular diferentes meios de cultura visando avaliar a produção de protease.

3.1.2.2 EFEITO DE DIFERENTES SUBSTRATOS E COSUBSTRATOS NA PRODUÇÃO DE PROTEASE

Cultivos submersos para produção de proteases foram realizados em triplicata, em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meio de cultura. Meio mineral (K_2HPO_4 , 0,3 g/L; KH_2PO_4 , 0,4 g/L; NaCl, 0,5 g/L) foi adicionado a diferentes substratos, e o pH do meio foi ajustado para 7,5 antes da esterilização em autoclave. Os meios foram inoculados com 1 mL da suspensão bacteriana e as incubações ocorreram a 30 °C, 125 rpm, por até 6 dias. Em intervalos específicos, os meios de cultura foram amostrados assepticamente (500 μ L) e, após centrifugação (10.000 \times g, 10 min), os sobrenadantes de cultivo foram avaliados quanto à atividade proteolítica.

Inicialmente, diferentes substratos foram adicionados ao meio mineral na concentração de 10 g/L. Os substratos avaliados foram: penas de frango (CF), penas moídas (MF), escamas de peixe moídas (FS), farelo de soja (SM), soro de leite liofilizado (LW), farinha de ossos (BM), caseína (CA), isolado de proteína de soro de leite (WPI), peptona (PE), caldo infusão cérebro-coração (BHI), e caldo triptona de soja (TSB). O bagaço de mandioca (CB) também foi explorado; neste caso, CB foi adicionado com NH_4Cl (1 g/L) como fonte de nitrogênio inorgânico (CB+IN).

O substrato que resultou na maior produção de proteases foi selecionado e o efeito de diferentes concentrações (10, 20, 30, 40 e 50 g/L) no rendimento de proteases foi investigado. A concentração de substrato em que ocorreu a maior produção de protease foi selecionada e, em seguida, o rendimento de protease foi avaliado com a adição de diferentes cosubstratos (1 g/L). Os cosubstratos utilizados foram: MF, SM, LW, CB, CA, PE, glicose, isolado de proteína de soja (SPI), NH_4Cl e $(NH_4)_2SO_4$. O soro de queijo líquido (CW) também foi avaliado como cosubstrato; neste caso, 50 mL de CW foram usados em vez de água destilada. Posteriormente, foi avaliado o efeito de diferentes concentrações do cosubstrato selecionado (1,0; 2,5; 5,0; 7,5; e 10,0 g/L) sobre a produção de proteases. O meio que sustentou a maior produção de proteases foi definido como o meio otimizado.

3.1.2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A produção de proteases extracelulares foi avaliada nos sobrenadantes de cultivo (protease bruta), obtidos após centrifugação (10.000 \times g, 10 min) de alíquotas (500 μ L) do meio de cultura. A atividade proteolítica foi mensurada usando

azocaseína como substrato, na temperatura e pH ótimos previamente relatados para a protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 (SOBUCKI; RAMOS; DAROIT, 2017).

Neste ensaio, 10 µL do sobrenadante de cultivo foram adicionados a 190 µL de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) e 300 µL de azocaseína (10 g/L, preparada no mesmo tampão). As incubações ocorreram a 55 °C por 15 min, e as reações foram encerradas com 600 µL de ácido tricloroacético (TCA; 100 g/L). Após centrifugação (10.000 × g, 5 min), 800 µL de sobrenadante foram adicionados a 200 µL de NaOH 1,8 N e, em seguida, a absorbância foi mensurada a 420 nm. Os brancos foram preparados adicionando água destilada em vez de sobrenadantes. Os controles foram preparados adicionando TCA antes da adição de sobrenadantes de cultivo. Uma unidade de atividade proteolítica (U) foi definida arbitrariamente como a quantidade de enzima necessária para aumentar 0,1 unidades Abs a 420 nm nas condições do ensaio. Estes ensaios foram realizados em triplicatas.

3.1.2.4 PROTEÍNAS SOLÚVEIS E BIOATIVIDADES *IN VITRO* DURANTE CULTIVOS EM MEIO OTIMIZADO

A concentração de proteínas solúveis nos sobrenadantes de cultivo foi avaliada, em triplicatas, pelo método Folin-fenol (LOWRY et al., 1951), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

As atividades antioxidantes foram avaliadas nos sobrenadantes de cultivo através da eliminação de radicais 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e da capacidade quelante de Fe²⁺. Os ensaios foram realizados em triplicatas. A eliminação do radical ABTS foi determinada com base no método de Re et al. (1999). O radical ABTS foi preparado adicionando 88 µL de K₂S₂O₈ (140 mM) a 5 mL de solução ABTS (7 mM). Essa mistura permaneceu à temperatura ambiente, no escuro, por cerca de 16 h antes do uso. A solução do radical ABTS foi diluída em solução salina tamponada com fosfato (5 mM; pH 7,4) para atingir uma absorbância (Abs) de 0,700 (± 0,02) unidades a 734 nm. A solução do radical (1 mL) foi adicionada a 5 µL de sobrenadantes de cultivo e, após 6 min à temperatura ambiente, a Abs. desta mistura foi mensurada a 734 nm. Os controles foram preparados usando água destilada no lugar da amostra. A eliminação dos radicais ABTS foi calculada como:

$$\text{Percentual de eliminação (\%)} = [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}}] \times 100$$

A atividade quelante de Fe^{2+} foi avaliada pelo método da ferrozina (CALLEGARO; WELTER; DAROIT, 2018). Os sobrenadantes da cultivo (25 μL) foram adicionados a 3,7 mL de água destilada, 100 μL de 2 mM FeSO_4 e 200 μL de 5 mM ferrozina [3-(2-piridil)-5,6-bis(4-ácido fenil sulfônico)-1,2,4-triazina]. A Abs. a 562 nm foi lida após 10 min. Os controles foram preparados usando água destilada no lugar da amostra. Os resultados foram expressos como:

$$\text{Capacidade quelante de Fe}^{2+} (\%) = [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}}] \times 100$$

A inibição da atividade da enzima dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) foi utilizada para avaliar o potencial antidiabético *in vitro* (ZHANG et al., 2015). Os sobrenadantes de cultivo (25 μL), em triplicata, foram adicionados a 25 μL de 2,0 mM Gly-Pro *p*-nitroanilida (em tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 7,6), e esta mistura foi pré-incubada (37 °C, 10 min). As reações foram iniciadas pela adição de 50 μL de DPP-IV (0,01 U/mL, em tampão Tris-HCl). Após a incubação (37 °C, 60 min), as reações foram encerradas usando 100 μL de tampão acetato (1 M, pH 4,0). As absorvâncias (Abs) foram então medidas a 405 nm. A inibição de DPP-IV foi calculada como:

$$\text{Inibição (\%)} = \{1 - [(A - B) / (C - D)]\} \times 100,$$

onde A é a Abs em reações contendo DPP-IV, substrato e sobrenadantes de cultivo; B é a Abs em reações contendo substrato, sobrenadantes de cultivo e tampão (substituindo a DPP-IV); C é a Abs em reações contendo DPP-IV, substrato e água destilada (substituindo os sobrenadantes); D é a Abs em reações contendo substrato, com tampão e água destilada substituindo DPP-IV e sobrenadantes, respectivamente.

O potencial anti-hipertensivo *in vitro* dos sobrenadantes foi avaliado, em triplicata, por meio da capacidade em inibir a atividade da enzima conversora de angiotensina-I (ACE) (CUSHMAN; CHEUNG, 1971). Sobrenadantes de cultivo (10 μL) foram adicionados a 50 μL do substrato hipuril-histidil-leucina (8 mM; preparado em tampão HEPES-HCl 50 mM com 300 mM NaCl, pH 8,3), e esta mistura foi incubada (37 °C, 5 min). A ACE foi então adicionada (20 μL ; 0,1 U/mL) e as reações realizadas a 37 °C por 15 min. As reações foram encerradas pela adição de 80 μL de 1 M HCl. O ácido hipúrico liberado foi extraído com 1 mL de acetato de etila e a fase orgânica foi transferida para um tubo de vidro. Após a evaporação do acetato de etila em estufa, o material restante no tubo de vidro foi dissolvido usando 800 μL

de água destilada, e a absorvância foi então avaliada a 228 nm. A inibição da ACE foi calculada como:

$$\text{Inibição (\%)} = \{1 - [(A - B) / (C - D)]\} \times 100,$$

onde A é a Abs em reações contendo ACE, substrato e sobrenadantes de cultivo; B é a Abs em reações contendo substrato, sobrenadantes de cultivo e tampão (substituindo a ACE); C é a Abs em reações contendo ACE, substrato e água destilada (substituindo os sobrenadantes); D é a Abs em reações contendo substrato, com tampão e água destilada substituindo a ACE e os sobrenadantes, respectivamente.

3.1.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão, calculado a partir das replicatas. As comparações entre médias foram realizadas usando o teste de Tukey, e as diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

3.1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.3.1 PRODUÇÃO DE PROTEASE: SELEÇÃO DO SUBSTRATO PRINCIPAL

A produção de protease extracelular por *Bacillus* sp. CL18 foi inicialmente avaliada usando 12 substratos (10 g/L). Os resultados obtidos indicaram que substratos distintos tiveram clara influência na produção de proteases (Fig. 1). Os menores valores (< 26 U/mL) foram observados nos meios CB+IN e LW. O CB, um subproduto rico em carboidratos oriundo do processamento da mandioca para obtenção de amido, é mais comumente usado como fonte de carbono para a produção de carboidrases microbianas; no entanto, seu baixo teor de nitrogênio pode limitar a produção de enzimas por microrganismos (DE FREITAS et al., 2014). Assim, a baixa produção de protease com CB+IN (Fig. 1) pode indicar a preferência de *Bacillus* sp. CL18 por fontes orgânicas de nitrogênio.

O soro de queijo, um dos subprodutos mais importantes e ambientalmente problemáticos da produção de queijo, foi relatado anteriormente como um substrato adequado para a produção de proteases por *Bacillus subtilis* MTCC 2616 (SAHOO et al., 2020). No entanto, assim como observado para *Bacillus* sp. CL18 (Fig. 1), não foi apropriado para a produção de proteases por *Chryseobacterium* sp. kr6 (CASARIN; CLADERA-OLIVERA; BRANDELLI, 2008) e *Bacillus* sp. P45 (DAROIT;

CORRÊA; BRANDELLI, 2011). Os principais constituintes do LW utilizados no presente estudo foram açúcares (~74%, base seca; particularmente lactose) e proteínas (~15%, base seca). Nesse sentido, o baixo teor de proteína do LW pode ter afetado negativamente a produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18.

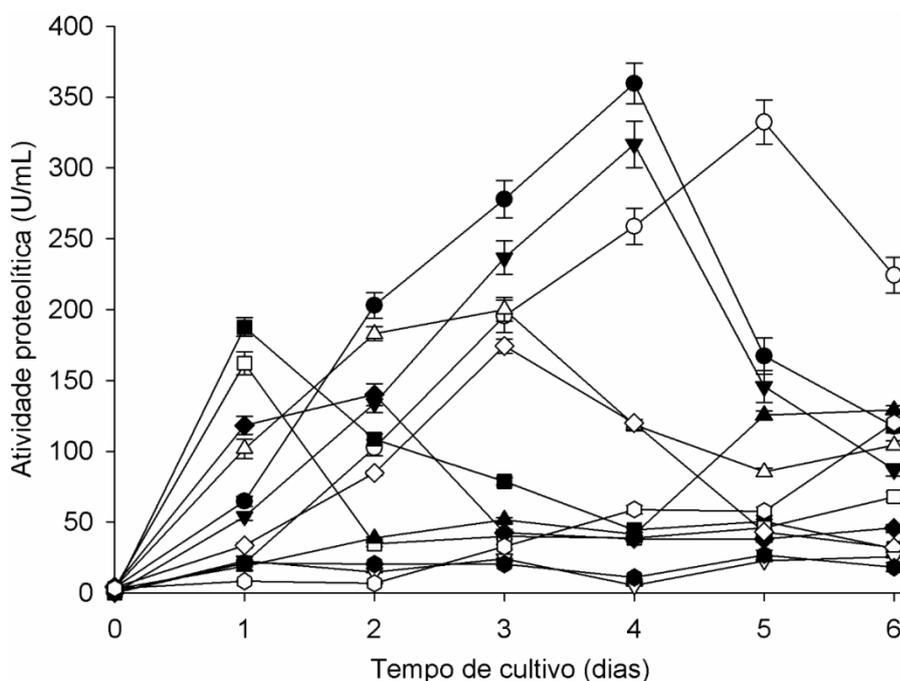


Figura 1 - Triagem de substratos para a produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18. Os substratos avaliados (10 g/L) foram: escamas de peixe (FS; ●), penas de frango (CF; ○), penas moídas (MF; ▼), farelo de soja (SM; □), peptona (PE; ■), caldo triptona de soja (TSB; □), caldo infusão cérebro-coração (BHI; □), proteína isolada do soro de queijo (WPI; ▲), farinha de ossos (BM; ○), caseína (CA; □), soro de queijo liofilizado (LW; □), bagaço de mandioca adicionado de 1 g/L NH₄Cl (CB+IN; □).

O rendimento de protease atingiu 120-140 U/mL nos meios WPI, CA e BM (Fig. 1). A WPI (≥ 90% proteína), produto comercial obtido a partir da concentração de proteínas do soro de queijo, suportou maior produção de enzimas proteolíticas em relação ao LW (Fig. 1). Isso pode reforçar a noção de que o baixo teor de proteína neste último foi um fator importante para o rendimento de protease. No entanto, quando comparado à maior produção de proteases observada em outros meios (Fig. 1), a WPI não é adequada à produção de proteases como único substrato, o que pode resultar da restrita capacidade de *Bacillus* sp. CL18 em explorá-lo.

A produção relativamente baixa de proteases observada no meio contendo CA (Fig. 1), um produto comercial obtido da coagulação do leite, sugere sua capacidade limitada de induzir a produção de proteases, como demonstrado anteriormente (RIFFEL; DAROIT; BRANDELLI, 2011). No entanto, a CA tem sido utilizada com sucesso como ingrediente em meios de cultura para obtenção de proteases por diferentes microrganismos, como *Bacillus* sp. AS-S20-I (MUKHERJEE; RAI, 2011). A BM, comumente usada como fertilizante e ingrediente na alimentação animal, foi recentemente descrita como um substrato apropriado (10 g/L) para a produção de enzimas proteolíticas por *Bacillus tequilensis* WS14 (BAQUEIRO-PEÑA et al., 2019), o que não foi observado no caso de *Bacillus* sp. CL18 (Fig. 1).

As máximas produções de protease nos meios PE, TSB e BHI foram semelhantes entre si (160-185 U/mL), embora os picos de atividade tenham sido detectados em diferentes tempos (Fig. 1). A baixa produção relativa de protease em meios contendo peptona como substrato único também é relatada em outros estudos (JOO; CHANG, 2005; RIFFEL; DAROIT; BRANDELLI, 2011; THYS et al., 2006). Contudo, mesmo com seus altos custos, peptonas e outros ingredientes/meios comerciais têm sido usados para obter proteases devido aos maiores rendimentos enzimáticos (KARBALAEI-HEIDARI et al., 2009; LERMEN et al., 2022).

As peptonas são compostas principalmente por aminoácidos e peptídeos. TSB e BHI, além das peptonas, também contêm glicose; o meio BHI ainda compreende infusões de cérebros e corações bovinos ou suínos (CLOWERS et al., 2013). A produção de proteases nestes meios pode não resultar do caráter indutor de seus ingredientes, mas sim de limitações nutricionais, principalmente em relação a aminoácidos e peptídeos. Nesse sentido, substratos de fácil acesso pelos microrganismos podem suportar o crescimento microbiano enquanto suprimem a produção de proteases. Com o consumo dos substratos e a consequente diminuição da qualidade nutricional do meio, os microrganismos passam a secretar enzimas proteolíticas para se adaptarem ao estresse nutricional (ADIGÜZEL et al., 2009).

O SM, subproduto do processamento da soja para obtenção do óleo, amplamente disponível, de baixo custo e rico em proteínas, geralmente é direcionado à nutrição animal. Estudos sobre a otimização da composição de meios de cultura indicam a viabilidade do SM como substrato para a produção de

proteases por linhagens *Bacillus* (JOO; CHANG, 2005; XIE et al., 2022). Embora o SM tenha sido capaz de induzir a produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 (200 U/mL; dia 3), o rendimento enzimático foi menor em comparação com outros substratos (Fig. 1), o que também foi relatado para *Microbacterium* sp. kr10 (THYS et al., 2006) e *Halobacillus andaensis* MQ (DELGADO-GARCÍA et al., 2019).

A bactéria queratinolítica *Bacillus* sp. CL18 foi previamente investigada quanto à produção de enzimas proteolíticas usando CF como substrato (SOBUCKI; RAMOS; DAROIT, 2017). No presente estudo, a produção de protease nos meios CF e MF atingiu 332 U/mL (dia 5) e 316 U/mL (dia 4), respectivamente (Fig. 1). Penas de frango são resíduos ricos em proteínas (~90% proteína, base seca), abundantemente gerados pela indústria avícola. Seu uso como substrato para a produção de proteases por outros microrganismos queratinolíticos tem sido amplamente explorado (AKRAM; HAQ; JABBAR, 2020; CAVELLO; BEZUS; CAVALITTO, 2021; KALAIKUMARI et al., 2019). A moagem das penas (MF), embora não tenha aumentado os rendimentos de protease, acelerou o processo de produção (Fig. 1). O aumento da área superficial (diminuição do tamanho das partículas) da MF em comparação às CF pode ter facilitado o ataque microbiano/enzimático. No entanto, materiais queratinosos podem não ser os mais adequados para a obtenção de proteases (Fig. 1), indicando a importância da triagem de diversos substratos para otimizar a produção de enzimas (HAMMAMI et al., 2020; JOO; CHANG, 2005).

Nesse contexto, dentre os substratos inicialmente avaliados (10 g/L), a máxima produção de protease foi detectada no meio FS, alcançando 360 U/mL aos 4 dias de cultivo (Fig. 1). Escamas de peixe estão entre os resíduos gerados em grande quantidade pela indústria de processamento de pescado. Esses resíduos são ricos em proteínas e minerais, representados principalmente por colágeno e hidroxiapatita, respectivamente. O substrato FS utilizado neste estudo, obtido de tilápia (*Oreochromis* sp.), apresentou 11,8% de umidade, 40,4% de proteína bruta, 13,6% de gordura, 6,7% de carboidratos e 27,5% de cinzas (minerais).

Alguns estudos descrevem o uso de FS para a obtenção de proteases microbianas, como estratégia para valorização destes resíduos. Rebeca et al. (REBECCA et al., 2012) indicaram escamas de peixe como substratos adequados para a produção de proteases por *Aspergillus niger* através de fermentação em estado sólido. A produção de protease por *Vogesella* sp. 7307-1 foi realizada em

cultivos submersos usando escamas de peixe (5 g/L) como principal substrato orgânico (PAN et al., 2010). Gaonkar e Furtado (2021) relataram que a produção de proteases por *Haloferax lucentensis* GUBF-2 MG076078 foi semelhante usando FS e MF (50 g/L); no entanto, esses substratos sustentaram uma produção de protease que foi ~20% menor do que aquela observada usando resíduos de camarão.

Uma vez que a FS originou os melhores resultados, os efeitos de diferentes concentrações foram avaliados. As concentrações de 20 e 30 g/L aumentaram a produção de protease em comparação ao uso de 10 g/L de FS no 4º dia de cultivo (Fig. 2). Neste ponto, a atividade proteolítica produzida com 30 g/L de FS foi de 496 U/mL, ou seja, 38% superior àquela observada com 10 g/L de FS.

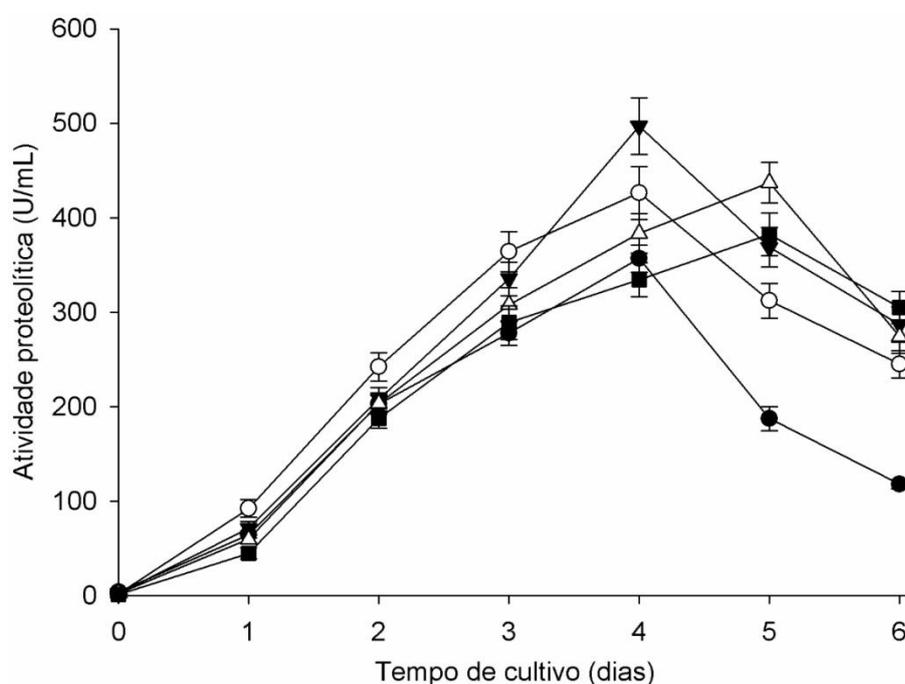


Figura 2 - Produção de protease por *Bacillus* sp. CL18 em meio mineral contendo diferentes concentrações de escamas de peixe (FS). As concentrações de FS avaliadas foram: 10 (●), 20 (○), 30 (▼), 40 (△), e 50 g/L (■).

O uso de 40 ou 50 g/L de FS retardou o pico de produção de protease (dia 5). A produção de proteases por *Bacillus altitudinis* GVC11, usando escamas de cinco espécies de peixes como substratos, foi previamente avaliada (HARIKRISHNA et al., 2017). Dentre as escamas investigadas, aquelas de *Labeo rohita* resultaram na maior produção de proteases (aqui considerada como 100%) quando usadas a 5 g/L, após 2 dias de cultivo. Na mesma concentração (5 g/L) e tempo de cultivo (2 dias), escamas de *Catla catla* resultaram em uma produção 17% menor. O uso de

escamas de outras espécies de peixes resultou em rendimentos 32-55% menores, com picos de produção alcançados com o uso de 10-20 g/L após 2-3 dias de cultivo (HARIKRISHNA et al., 2017).

A maior produção de protease em concentrações crescentes de FS até um ponto máximo, seguida por quedas na produção à medida que a concentração de substrato foi aumentada, também foi previamente relatada (BHAGWAT et al., 2018; HARIKRISHNA et al., 2017). Esse fenômeno também é comumente observado para outros substratos, como CF, MF e SM. Em concentrações mais altas, o aumento da viscosidade do meio dificultaria a transferência de massa, reduzindo a disponibilidade de oxigênio para os microrganismos. Além disso, uma produção diminuída de proteases pode ocorrer devido à inibição/repressão causada por produtos de degradação do substrato, como aminoácidos e peptídeos (AKRAM; HAQ; JABBAR, 2020; NNOLIM et al., 2020; XIE et al., 2022).

3.1.3.2 PRODUÇÃO DE PROTEASE: SELEÇÃO DO COSUBSTRATO

A concentração de 30 g/L de FS foi selecionada (FS30) para a produção de protease, e os efeitos da suplementação do meio com diferentes cosubstratos (1 g/L) foram avaliados. A adição de CA reduziu os rendimentos enzimáticos (Fig. 3), conforme relatado para a produção de proteases queratinolíticas por *Myrothecium verrucaria* em culturas submersas usando CA (10 g/L) como suplemento à MF (10 g/L) (GIOPPO et al., 2009). O efeito da glicose foi menos pronunciado, mas sua adição diminuiu a produção da enzima no 4º dia de cultivo, em comparação com FS30 (Fig. 3). Embora a adição de PE tenha aumentado a produção de proteases no início dos cultivos (dias 1-2), a atividade proteolítica não atingiu aquela detectada no meio FS30. Os efeitos do uso de CA, PE e glicose (Fig. 3) podem derivar da menor complexidade desses cosubstratos e/ou mecanismos de repressão (DAROIT; BRANDELLI, 2014; KALAIKUMARI et al., 2019). No entanto, pesquisas anteriores mostraram que a suplementação do meio FS com PE, ou com glicose e ureia, resultou em aumento da produção de protease por *Aspergillus niger* AB₁₀₀ (BASU; BANIK; DAS, 2008).

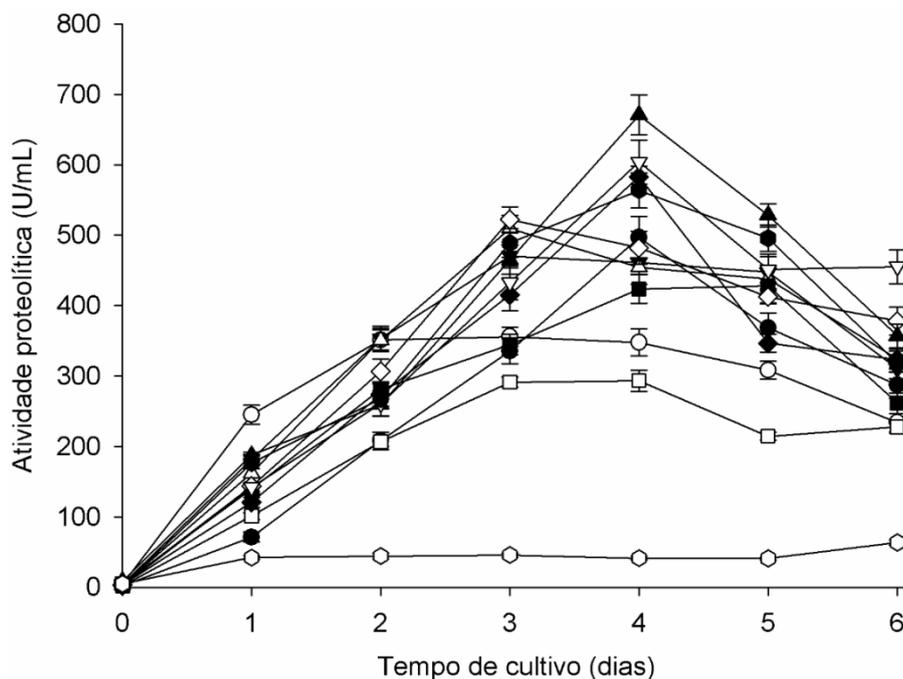


Figura 3 - Produção de protease por *Bacillus* sp. CL18 em meio mineral contendo 30 g/L de escamas de peixe (FS30) e suplementado com diferentes cosubstratos. Os cosubstratos avaliados (1 g/L) foram: penas moídas (MF; ▲), farelo de soja (SM; △), peptona (PE; ○), caseína (CA; □), soro de queijo liofilizado (LW; ◇), bagaço de mandioca (CB; ◆), proteína isolada de soja (SPI; ▼), glicose (■), NH_4Cl (▽), e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (●). Soro de queijo líquido (CW; ◇) foi testado em substituição à água destilada (50 mL) no meio FS30. A produção de protease no meio FS30, sem suplementação (●), foi adicionada à figura para comparação.

LW, SPI e SM afetaram positivamente os rendimentos de protease em tempos de cultivo mais curtos (dias 2-3), em comparação com o meio FS30. Com esses suplementos, cultivos realizados por 3 dias mostraram produções de proteases (470-520 U/mL) semelhantes àquela detectada no meio FS30 no dia 4 (Fig. 3). Basu et al. (BASU; BANIK; DAS, 2008) indicaram aumento da produção de protease por *Aspergillus niger* AB₁₀₀ com a adição de SM ao meio FS. O uso de soro de leite como cosubstrato para a produção de proteases foi demonstrado para *Bacillus* sp. SMIA-2 em meio composto de farinha de casca de maracujá (2,5 g/L) e concentrado de soro de leite (5 g/L) (BARBOSA et al., 2014). A suplementação de FS30 com CW (50 mL, substituindo a água destilada) inibiu drasticamente a produção de proteases (Fig. 3), o que pode resultar de repressão catabólica e até mesmo estresse osmótico, considerando que CW apresentou 51 g/L de matéria seca, principalmente consistindo de carboidratos (CLERICI; LERMEN; DAROIT, 2021).

A adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , CB ou MF aumentou os rendimentos de protease no 3º e 4º dias de cultivo, em comparação com o meio FS30. A produção máxima foi observada no 4º dia, atingindo 564, 583, 604 e 670 U/mL nos meios suplementados com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , CB e MF, respectivamente (Fig. 3). A adição de fontes inorgânicas de nitrogênio a meios de cultura contendo substratos complexos pode resultar em maiores rendimentos de protease (EMRAN; ISMAIL; HASHEM, 2020; HAMMAMI et al., 2020); no entanto, a suplementação pode diminuir a produção de enzimas (HAMMAMI et al., 2018; RIFFEL; DAROIT; BRANDELLI, 2011). Tais efeitos (positivos/negativos) dependem do tipo e concentração da fonte de nitrogênio inorgânico, bem como do microrganismo e do(s) substrato(s) principal(is) no meio de cultura. Essas peculiaridades, juntamente com as já apresentadas acima, ao indicarem que não há meio de cultura comum para o maior rendimento de proteases, reforçam a relevância dos esforços de otimização para microrganismos específicos (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011; KASANA; SALWAN; YADAV, 2011).

A elevação da produção de proteases no meio FS30 contendo CB (Fig. 3), juntamente com a produção comparativamente baixa no meio CB+IN (Fig. 1), reforça a noção de que *Bacillus* sp. CL18 pode necessitar de fontes específicas de nitrogênio orgânico para produção de proteases, e também indica a viabilidade do uso de CB como fonte suplementar de carbono neste contexto. Estudos sobre a produção de proteases microbianas utilizando CB como cosubstrato são escassos. Em uma investigação com *Bacillus* sp. CL33A, a adição de CB (5-10 g/L) à MF (30 g/L) aumentou os rendimentos de protease (CLERICI; LERMEN; DAROIT, 2021). A suplementação de MF (10 g/L) com CB (10 g/L) também aumentou a produção de protease em cultivos submersos com *Myrothecium verrucaria* (GIOPPO et al., 2009).

O melhor cosubstrato foram as MF. Os resultados obtidos no meio FS30 suplementado com 1 g/L MF (Fig. 3), bem como aqueles apresentados na seleção de substratos (Fig. 1), sugerem que substratos proteicos complexos podem ser preferidos por *Bacillus* sp. CL18 para produção de protease. FS e MF são substratos recalcitrantes compostos principalmente por colágeno e queratina, respectivamente. Nesse caso, a secreção de proteases pode ser uma resposta à disponibilidade limitada desses substratos para o crescimento microbiano, atuando assim como indutores indiretos para a produção dessas enzimas (DAROIT; BRANDELLI, 2014).

O efeito de diferentes concentrações de MF no meio FS30 foi então avaliado (Fig. 4). A suplementação com 2,5 ou 7,5 g/L de MF não afetou a produção máxima de protease, quando comparada a 1 g/L de MF; entretanto, o uso de MF a 5 g/L aumentou o rendimento de protease, com pico de 780 U/mL aos 4 dias de cultivo. Não houve diferenças entre os picos de produção observados com MF em 2,5 e 5 g/L. O aumento da concentração de MF para 10 g/L, e especialmente para 15 e 20 g/L, levou a uma produção de protease significativamente menor (Fig. 4), sugerindo efeitos negativos sobre a disponibilidade de oxigênio e/ou processos de repressão.

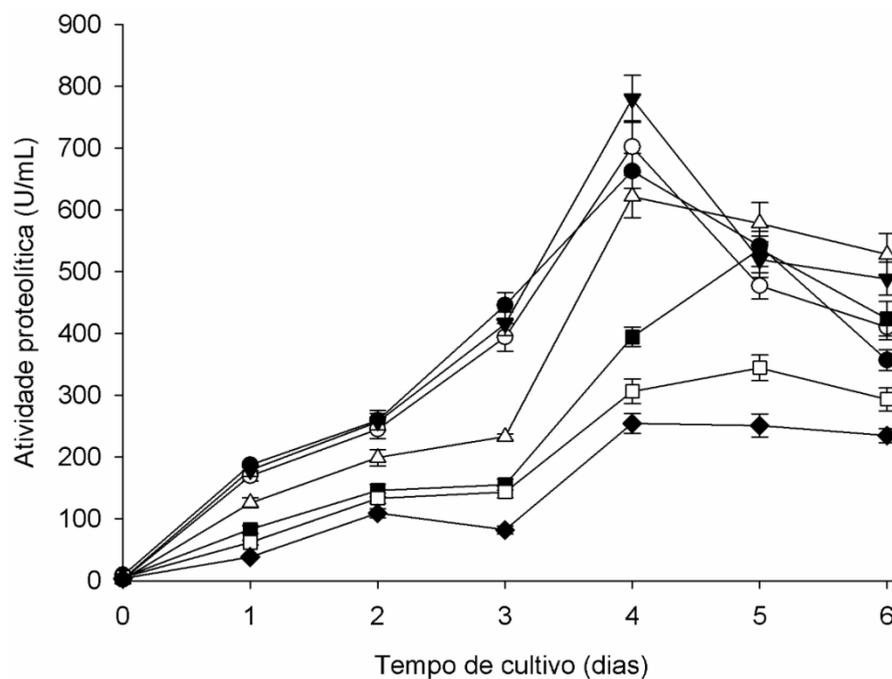


Figura 4 - Produção de protease por *Bacillus sp.* CL18 em meio mineral contendo 30 g/L de escamas de peixe (FS30) suplementado com diferentes concentrações de penas moídas (MF). As concentrações de MF avaliadas foram: 1,0 (●), 2,5, (○), 5,0 (▼), 7,5 (△), 10,0 (■), 15,0 (□), e 20,0 g/L (◆).

Portanto, após a triagem do melhor substrato, cosubstrato, e suas concentrações, o meio composto por 30 g/L de FS e 5 g/L de MF (FS30+MF5) resultou na maior produção de protease. A partir da abordagem de otimização, a produção de proteases por *Bacillus sp.* CL18 no meio FS30+MF5 (Fig. 4) foi 116% maior em comparação com 10 g/L de FS (Fig. 1), e duas vezes maior do que a produção de protease relatada anteriormente para esta bactéria em meio à base de penas (SOBUCKI; RAMOS; DAROIT, 2017).

De nosso conhecimento, o uso de FS suplementado com MF (ou CB) para a obtenção de proteases microbianas é relatado pela primeira vez. Basu et al. (BASU;

BANIK; DAS, 2008) observaram que, além de glicose e ureia, PE e SM, a suplementação de meio FS com licor de maceração de milho também aumentou a produção de protease por *Aspergillus niger* AB₁₀₀. Em meio contendo glicose (10 g/L) como fonte de carbono, a substituição de peptona (5 g/L) e extrato de levedura (5 g/L) por FS (10 g/L) como fonte de nitrogênio resultou em maior protease produção por *Bacillus licheniformis* K-3; no entanto, cascas de feijão mungo ou SM foram mais adequadas em comparação à FS (SINGH; BAJAJ, 2017b). A produção máxima de proteases por *Bacillus cereus* SUK ocorreu em meio composto de FS desmineralizado (9,4 g/L) e melaço (2,4 g/L) (BHAGWAT et al., 2018).

3.1.3.3 PROTEÍNA SOLÚVEL E BIOATIVIDADES *IN VITRO* DURANTE CULTIVOS NO MEIO OTIMIZADO

Estes parâmetros foram mensurados usando os sobrenadantes (hidrolisados) coletados durante os cultivos de *Bacillus* sp. CL18 no meio otimizado FS30+MF5. Para fins de comparação, o conteúdo de proteínas solúveis e bioatividades também foram avaliadas em hidrolisados obtidos durante cultivos no meio FS30.

A concentração inicial de proteínas solúveis nos hidrolisados de FS30+MF5 (3,6 mg/mL) foi aumentada para 5,2 mg/mL no dia 1, diminuindo depois para 3,3-3,6 mg/mL nos dias 4-6. Os teores de proteínas solúveis no meio FS30 seguiram a mesma tendência, embora tenham sido inferiores devido à ausência de MF (Fig. 5a).

Em ambos os hidrolisados investigados, incrementos na concentração de proteína solúvel podem ser atribuídos à clivagem enzimática das proteínas de FS e MF pelas proteases bacterianas. Embora a proteína solúvel possa se acumular no meio de cultura, deve-se considerar que os peptídeos e aminoácidos liberados também são consumidos para sustentar o crescimento microbiano (CALLEGARO; BRANDELLI; DAROIT, 2019).

As atividades biológicas dos hidrolisados gerados através da conversão microbiana de biomassas residuais vêm recebendo crescente atenção. No caso de subprodutos animais, as atividades antioxidantes dos hidrolisados estão relacionadas principalmente aos peptídeos liberados dos substratos ricos em proteínas. Particularmente, o potencial antioxidante exibido por tais hidrolisados pode ser relevante tanto do ponto de vista da saúde quanto da indústria de alimentos (MARTÍ-QUIJAL et al., 2021).

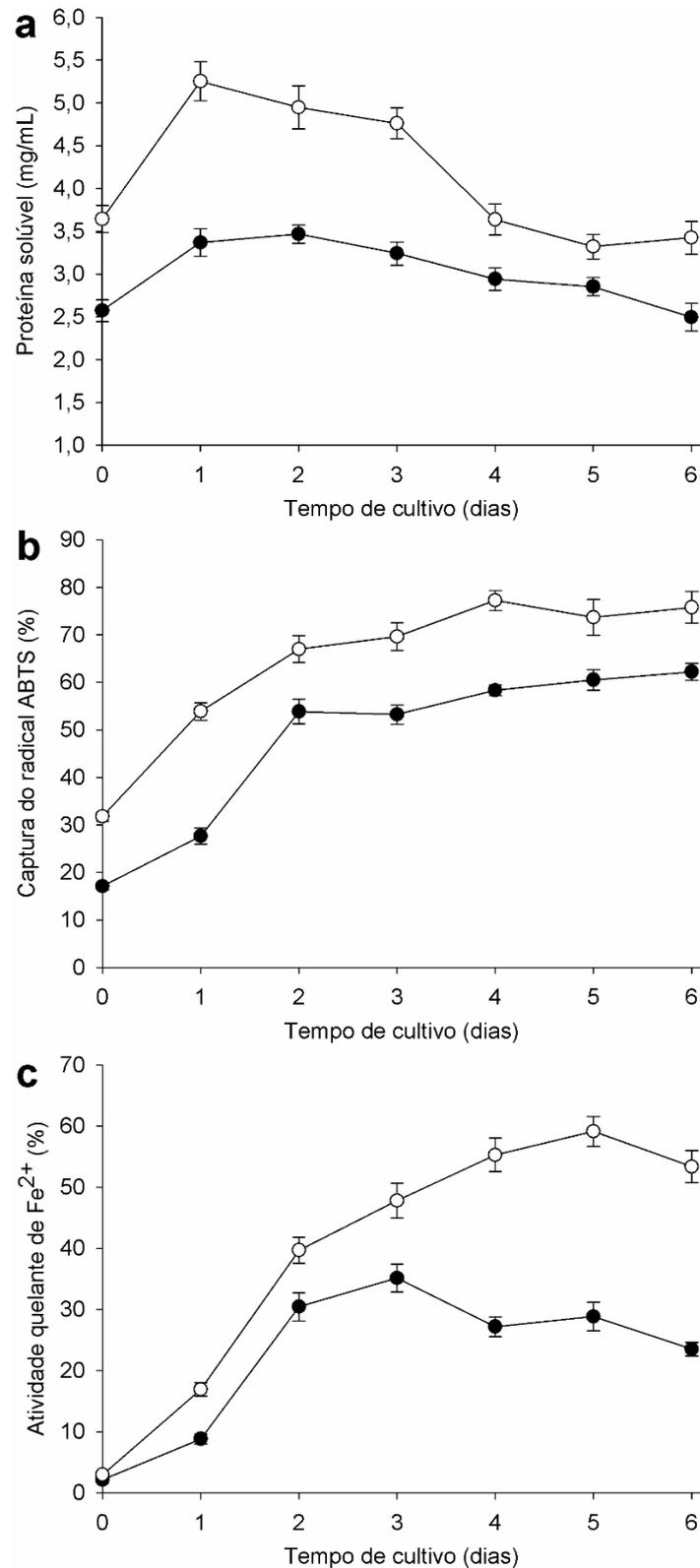


Figura 5 - Concentração de proteínas solúveis (a), Captura do radical ABTS (b), e quelação de Fe²⁺ (c) avaliados em hidrolisados coletados durante cultivos de *Bacillus* sp. CL18 nos meios FS30 (●) e FS30+MF5 (○).

Assim, as atividades antioxidantes *in vitro* em sobrenadantes de cultivo foram avaliadas usando ensaios de captura de radicais e quelação de Fe²⁺. A eliminação

do radical ABTS nos hidrolisados FS30+MF5 aumentou de 31,7% (dia 0) para 77,2% (dia 4); no meio FS30, a eliminação inicial do radical (17,1%; dia 0) foi elevada para 58-62% nos dias 4-6 (Fig. 5b). Esses resultados indicam que o processamento bacteriano dos substratos liberou moléculas bioativas capazes de transferir elétrons e estabilizar os radicais-teste (LERMEN et al., 2022).

Os potenciais de quelação de Fe^{2+} , independentemente do meio, foram igualmente baixos no dia 0 (Fig. 5c). No entanto, os hidrolisados recuperados do meio FS30+MF5 apresentaram maiores potenciais de quelação em comparação àqueles do meio FS30. Particularmente, as maiores atividades quelantes (55,3-59,1%) foram observadas após 4-5 dias de cultivo no meio otimizado, enquanto a atividade máxima (37%) foi detectada ao 3º dia de cultivo no meio FS30 (Fig. 5c). A capacidade dos hidrolisados de quelar íons ferrosos é considerada uma propriedade antioxidante indireta, uma vez que o Fe^{2+} é conhecido como um íon metálico pró-oxidante. Assim, a quelação torna o Fe^{2+} indisponível para participar de reações que levam à produção de radicais hidroxila prejudiciais (GULCIN; ALWASEL, 2022).

Os resíduos ricos em proteína produzidos pelo processamento de peixes e crustáceos são reportados como matérias-primas abundantes para a produção de hidrolisados antioxidantes por meio de conversão microbiana. Por exemplo, o bioprocessamento de resíduos de camarão por *Pseudomonas aeruginosa* A2 produziu hidrolisados com capacidade de eliminação de radicais e de quelação de Fe^{2+} (GHORBEL-BELLAAJ et al., 2018). Tais atividades antioxidantes também foram indicadas para hidrolisados obtidos através da bioconversão de resíduos do processamento de caranguejos por linhagens de *Pseudoalteromonas* (ZOU et al., 2021), e incrementos na capacidade de eliminação de radicais ABTS foram relatados para hidrolisados de resíduos de robalo, produzidos por fermentação por bactérias ácido-láticas (MARTÍ-QUIJAL et al., 2020).

Hidrolisados de resíduos de pele de peixe (*Scophthalmus maximus*), produzidos durante a fermentação com *Aspergillus oryzae* OAY1 (7 dias), apresentaram atividade de eliminação de radicais; além disso, hidrolisados (30 μL) foram capazes de quelar ~32% de íons ferrosos (FANG et al., 2017). A biodegradação de águas residuárias de perca-do-Nilo por duas espécies de *Bacillus* resultou em hidrolisados que exibiram habilidades de eliminação de radicais e quelação de Fe^{2+} . Especificamente, a eliminação do radical ABTS aumentou de

51,9% (dia 0) para 93,1% (dia 2,5), e a capacidade quelante de Fe^{2+} foi aumentada de 71,8% (dia 0) para 88,5% (dia 2,5) (MHINA; JUNG; KIM, 2020).

O potencial antidiabético *in vitro* de hidrolisados e peptídeos é comumente avaliado através da capacidade de inibição da DPP-IV, uma enzima que inativa incretinas, hormônios peptídicos fundamentais à homeostase glicêmica (LACROIX; LI-CHAN, 2016). As atividades de inibição de DPP-IV pelos hidrolisados no dia 0 foram baixas nos meios FS30 (2,8%) e FS30+MF5 (8,3%). As porcentagens de inibição aumentaram para 45-52% nos hidrolisados FS30 coletados após 1-3 dias de cultivo, mas as mais altas atividades de inibição foram observadas em hidrolisados obtidos de FS30+MF5, atingindo 65,0-73,0% após 1-4 dias de cultivo (Fig. 6a).

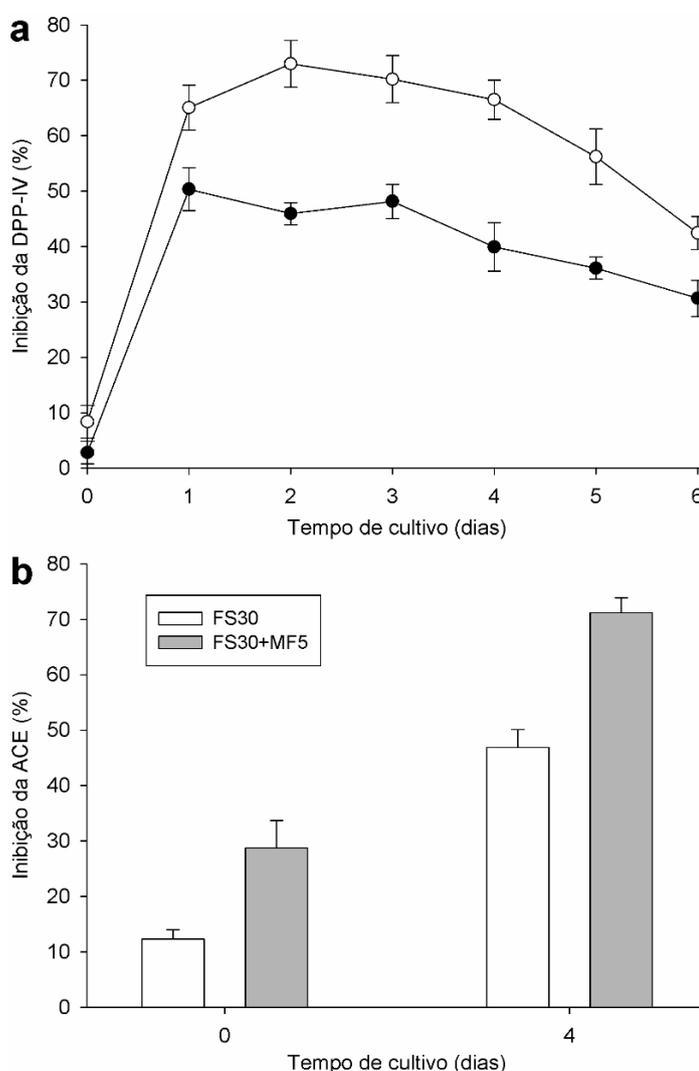


Figura 6 - Inibição *in vitro* da atividade da enzima dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV (a) e da enzima conversora de angiotensina-I (ACE) (b) por hidrolisados coletados durante cultivos de *Bacillus* sp. CL18 nos meios FS30 (●) e FS30+MF5 (○).

Avaliações da atividade anti-hipertensiva *in vitro* de hidrolisados proteicos são geralmente realizadas através da inibição da ACE, visto que esta enzima tem papel direto no aumento da pressão arterial (MARTIN; DEUSSEN, 2019). As porcentagens inibitórias iniciais (dia 0) foram de 12,3% e 28,7% nos meios FS30 e FS30+MF5, respectivamente. Tais atividades foram superiores após 4 dias de cultivo, atingindo 46,9% nos hidrolisados do meio FS30 e 71,2% naqueles do meio FS30+MF5 (Fig. 6b).

O processamento microbiano de resíduos agroalimentares é reconhecido como uma tecnologia adequada para a obtenção de hidrolisados anti-hipertensivos e antidiabéticos, embora esta última bioatividade pareça ser menos relatada. Em investigação prévia, a fermentação de resíduos de sementes de tomate por *Bacillus subtilis* A14h produziu peptídeos inibidores de ACE (MOAYEDI et al., 2017). Hidrolisados produzidos a partir da fermentação da saia do manto da vieira *Chlamys farreri* com uma linhagem de *Bacillus subtilis* (GAO et al., 2021), e de subprodutos de camarão durante a bioconversão com duas espécies de fungos (GAO et al., 2016), também inibiram a atividade da ACE. A liberação de peptídeos inibidores da DPP-IV e da ACE foi reportada para hidrolisados de borra de café produzidos por *Bacillus clausii* (RAMÍREZ; PINEDA-HIDALGO; ROCHÍN-MEDINA, 2021). A fermentação do albúmen de ovo por *Lactobacillus plantarum* FNCC 0027 durante 18 h aumentou a atividade inibidora da ACE dos hidrolisados para 36,7%, diminuindo posteriormente (NAHARIAH et al., 2015).

As FS são fontes valiosas de colágeno/gelatina, e hidrolisados obtidos a partir destas proteínas apresentam diversas atividades biológicas; no entanto, tais hidrolisados são produzidos principalmente usando enzimas proteolíticas (COPPOLA et al., 2021; TACIAS-PASCACIO et al., 2021). Embora muito menos explorado, o processamento microbiano de FS aparece como uma estratégia promissora para gerar hidrolisados bioativos. Por exemplo, os hidrolisados produzidos a partir de FS desmineralizado por *Bacillus cereus* SUK exerceram atividade antimicrobiana (BHAGWAT et al., 2018), e hidrolisados ricos em peptídeos obtidos através da biodegradação de FS por *Haloferax lucentensis* GUBF-2 MG076078 exibiram habilidade de eliminação de radicais (GAONKAR; FURTADO, 2021). Esta última investigação parece ser a única que apresenta a atividade antioxidante de hidrolisados de FS obtidos por bioconversão microbiana.

Portanto, o presente estudo indica que a quelação de íons ferrosos (Fig. 5c) também pode contribuir para o potencial antioxidante de hidrolisados de FS. De nosso conhecimento, este é o primeiro relato sobre as habilidades antidiabéticas e anti-hipertensivas *in vitro* de hidrolisados de FS produzidos por conversão microbiana (Fig. 6). Por outro lado, as bioatividades de hidrolisados produzidos durante o cultivo com diversas bactérias em meios à base de penas têm recebido mais atenção (CALLEGARO; BRANDELLI; DAROIT, 2019). Particularmente, usando os mesmos ensaios realizados na presente investigação, hidrolisados de penas produzidos por *Bacillus* sp. CL18 após 4 dias de cultivo em meio com 40 g/L de CF demonstraram 76% de captura de radicais ABTS, capacidade quelante de Fe²⁺ de 80%, sendo capazes de inibir as atividades de DPP-IV e ACE em 92% e 79%, respectivamente (CALLEGARO; WELTER; DAROIT, 2018). Em comparação com FS30, as bioatividades superiores observadas no meio FS30+MF5 (Fig. 5 e 6) representam a contribuição de peptídeos de queratina originados da hidrólise da MF.

3.1.4 CONCLUSÃO

As escamas de peixe (FS), as quais são resíduos ricos em colágeno, suportaram uma maior produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18. O rendimento de enzimas proteolíticas em meio à base de FS foi aumentado pela suplementação com penas moídas (MF), resíduos ricos em queratina. O uso de FS e MF no bioprocessamento proposto indica benefícios não apenas em termos de rendimento enzimático, mas também em relação aos custos de produção de proteases. Além disso, as atividades antioxidante, anti-hipertensiva e antidiabética foram aumentadas durante os cultivos bacterianos nos meios FS30 e FS30+MF5. A partir de uma abordagem de biorrefinaria, a geração simultânea desses produtos por meio da conversão microbiana contribui potencialmente para a reciclagem e valorização dessas biomassas recalcitrantes. As aplicações biotecnológicas da protease obtida, bem como a identificação de moléculas bioativas contidas nos hidrolisados, merecem investigações adicionais.

REFERÊNCIAS

ADIGÜZEL, A. C. et al. Sequential secretion of collagenolytic, elastolytic, and keratinolytic proteases in peptide-limited cultures of two *Bacillus cereus* strains isolated from wool. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 1, p. 226–234,

2009.

AGUILAR, Jessika Gonçalves dos Santos; SATO, Hélia Harumi. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, [S.L.], v. 103, p. 253-262, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.044>

AKRAM, F.; HAQ, I. UL; JABBAR, Z. Production and characterization of a novel thermo- and detergent stable keratinase from *Bacillus* sp. NKSP-7 with perceptible applications in leather processing and laundry industries. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 371–383, 2020.

BAQUEIRO-PEÑA, I. et al. Biotechnological potential of bacteria isolated from cattle environments of desert soils in Sonora Mexico. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 4, 2019.

BARBOSA, J. B. et al. Cheese whey and passion fruit rind flour as substrates for protease production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 4, p. 244–250, 2014.

BASU, B. R.; BANIK, A. K.; DAS, M. Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB₁₀₀ grown on fish scale. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 449–455, 2008.

BHAGWAT, P. K. et al. Use of statistical experimental methods for optimization of collagenolytic protease production by *Bacillus cereus* strain SUK grown on fish scales. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 28, p. 28226–28236, 2018.

CALLEGARO, K.; BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J. Beyond plucking: feathers bioprocessing into valuable protein hydrolysates. **Waste Management**, v. 95, p. 399–415, 2019.

CALLEGARO, K.; WELTER, N.; DAROIT, D. J. Feathers as bioresource: Microbial conversion into bioactive protein hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 1–9, 2018.

CASARIN, F.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Use of poultry byproduct for production of keratinolytic enzymes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 3, p. 301–305, 2008.

CAVELLO, I.; BEZUS, B.; CAVALITTO, S. The keratinolytic bacteria *Bacillus cytotoxicus* as a source of novel proteases and feather protein hydrolysates with antioxidant activities. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, p.

107, 2021.

CLERICI, N. J.; LERMEN, A. M.; DAROIT, D. J. Agro-industrial by-products as substrates for the production of bacterial protease and antioxidant hydrolysates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 37, n. September, p. 102174, 2021.

CLOWERS, B. H. et al. Characterization of residual medium peptides from *Yersinia pestis* cultures. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 8, p. 3933–3939, 2013.

COPPOLA, D. et al. Fish waste: from problem to valuable resource. **Marine Drugs**, v. 19, p. 116, 2021.

CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. **Biochemical Pharmacology**, v. 20, n. 7, p. 1637–1648, 1971.

DANILOVA, I.; SHARIPOVA, M. The practical potential of Bacilli and their enzymes for industrial production. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1782, 2020.

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. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 45–51, 2011.

DE FREITAS, A. C. et al. Production and application of amylases of *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* from industrial waste in acquisition of glucose. **Chemical Papers**, v. 68, n. 4, p. 442–450, 2014.

DELGADO-GARCÍA, M. et al. Bioprospection of proteases from *Halobacillus andaensis* for bioactive peptide production from fish muscle protein. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 39, p. 52–60, 2019.

EMRAN, M. A.; ISMAIL, S. A.; HASHEM, A. M. Production of detergent stable thermophilic alkaline protease by *Bacillus licheniformis* ALW1. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, p. 101631, 2020.

FANG, B. et al. Conversion of turbot skin wastes into valuable functional substances with an eco-friendly fermentation technology. **Journal of Cleaner Production**, v. 156, p. 367–377, 2017.

GAO, J. et al. Identification and antihypertension study of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from the skirt of *Chlamys farreri* fermented with

Bacillus natto. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 1, p. 146–158, 2021.

GAO, X. et al. Utilization of shrimp by-products by bioconversion with medical fungi for angiotensin I-converting enzyme inhibitor and antioxidant. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 25, n. 5, p. 694–707, 2016.

GAONKAR, S. K.; FURTADO, I. J. Valorization of low-cost agro-wastes residues for the maximum production of protease and lipase haloextremozymes by *Haloferax lucentensis* GUBF-2 MG076078. **Process Biochemistry**, v. 101, n. June 2020, p. 72–88, 2021.

GHORBEL-BELLAAJ, O. et al. Fermented shrimp waste hydrolysates: promising source of functional molecules with antioxidant properties. **Journal of Culinary Science and Technology**, v. 16, n. 4, p. 357–377, 2018.

GIOPPO, N. M. DA R. et al. Influence of the carbon and nitrogen sources on keratinase production by *Myrothecium verrucaria* in submerged and solid state cultures. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 705–711, 2009.

GULCIN, İ.; ALWASEL, S. H. Metal ions, metal chelators and metal chelating assay as antioxidant method. **Processes**, v. 10, p. 132, 2022.

HAMMAMI, A. et al. Low-cost culture medium for the production of proteases by *Bacillus mojavensis* SA and their potential use for the preparation of antioxidant protein hydrolysate from meat sausage by-products. **Annals of Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 473–484, 2018.

HAMMAMI, A. et al. Response-surface methodology for the production and the purification of a new H₂O₂-tolerant alkaline protease from *Bacillus invictae* AH1 strain. **Biotechnology Progress**, v. 36, p. e2965, 2020.

HARIKRISHNA, N. et al. Fish scales as potential substrate for production of alkaline protease and amino acid rich aqua hydrolyzate by *Bacillus altitudinis* GVC11. **Indian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 339–343, 2017.

HE, F. et al. Optimization of fermentation conditions for production of neutral metalloprotease by *Bacillus subtilis* SCK6 and its application in goatskin-dehairing. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 2021.

JOO, H. S.; CHANG, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3–4, p. 1263–1270, 2005.

- KALAIKUMARI, S. S. et al. Bioutilization of poultry feather for keratinase production and its application in leather industry. **Journal of Cleaner Production**, v. 208, p. 44–53, 2019.
- KARBALAEI-HEIDARI, H. R. et al. Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium *Halobacillus karajensis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 21–27, 2009.
- 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.
- LACROIX, I. M. E.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived dipeptidyl-peptidase IV inhibitors as a potential approach for glycemic regulation - Current knowledge and future research considerations. **Trends in Food Science and Technology**, v. 54, p. 1–16, 2016.
- LERMEN, A. M. et al. Characterization and application of a crude bacterial protease to produce antioxidant hydrolysates from whey protein. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, 2022.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.
- MARTÍ-QUIJAL, F. J. et al. Impact of fermentation on the recovery of antioxidant bioactive compounds from sea bass byproducts. **Antioxidants**, v. 9, p. 239, 2020.
- MARTÍ-QUIJAL, F. J. et al. Obtaining antioxidants and natural preservatives from food by-products through fermentation: a review. **Fermentation**, v. 7, p. 106, 2021.
- 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**, v. 59, n. 8, p. 1264–1283, 2019.
- MHINA, C. F.; JUNG, H. Y.; KIM, J. K. Recovery of antioxidant and antimicrobial peptides through the reutilization of Nile perch wastewater by biodegradation using two *Bacillus* species. **Chemosphere**, v. 253, p. 126728, 2020.
- MOAYEDI, A. et al. ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fragments obtained from tomato processing by-products fermented using *Bacillus subtilis*: effect of amino acid composition and peptides molecular mass distribution. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, p. 48–64, 2017.
- MUKHERJEE, A. K.; RAI, S. K. A statistical approach for the enhanced production of

- alkaline protease showing fibrinolytic activity from a newly isolated Gram-negative *Bacillus* sp. strain AS-S20-I. **New Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 182–189, 2011.
- NAHARIAH, N. et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor activity on egg albumen fermentation. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 28, n. 6, p. 855–861, 2015.
- NNOLIM, N. E. et al. Biochemical and molecular characterization of a thermostable alkaline metallo-keratinase from *Bacillus* sp. Nnolim-k1. **Microorganisms**, v. 8, p. 1304, 2020.
- PAN, M. H. et al. Purification and characterization of a fish scale-degrading enzyme from a newly identified *Vogesella* sp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 23, p. 12541–12546, 2010.
- RAMÍREZ, K.; PINEDA-HIDALGO, K. V.; ROCHÍN-MEDINA, J. J. Fermentation of spent coffee grounds by *Bacillus clausii* induces release of potentially bioactive peptides. **LWT**, v. 138, p. 110685, 2021.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.
- REBECCA, L. J. et al. Production and analysis of protease from *Aspergillus niger* using fish scales as substrate. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 10, p. 4597–4600, 2012.
- RIFFEL, A.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Nutritional regulation of protease production by the feather-degrading bacterium *Chryseobacterium* sp. kr6. **New Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 153–157, 2011.
- ROJAS, L. F.; ZAPATA, P.; RUIZ-TIRADO, L. Agro-industrial waste enzymes: perspectives in circular economy. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 34, p. 100585, 2022.
- SAHOO, A. et al. Nattokinase production from *Bacillus subtilis* using cheese whey: effect of nitrogen supplementation and dynamic modelling. **Journal of Water Process Engineering**, v. 38, p. 101533, 2020.
- SINGH, S.; BAJAJ, B. K. Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. **Energy, Ecology and Environment**, v. 2, n. 6, p. 370–386, 2017a.
- SINGH, S.; BAJAJ, B. K. Agroindustrial/forestry residues as substrates for production of thermoactive alkaline protease from *Bacillus licheniformis* K-3 having multifaceted

hydrolytic potential. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 2, p. 453–462, 2017b.

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, n. 29, p. 23125–23132, 2017.

TACIAS-PASCACIO, V. G. et al. Bioactive peptides from fisheries residues: a review of use of papain in proteolysis reactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 184, p. 415–428, 2021.

THYS, R. C. S. et al. Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 67–73, 2006.

XIE, F. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* 35 M can exclusively produce and secrete proteases when cultured in soybean-meal-based medium. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 209, n. P2, p. 112188, 2022.

ZHANG, Y. et al. Isolation and identification of dipeptidyl peptidase IV-inhibitory peptides from trypsin/chymotrypsin-treated goat milk casein hydrolysates by 2D-TLC and LC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 40, p. 8819–8828, 2015.

ZOU, Y. et al. Bioactivity screening of hydrolysates from brown crab processing side streams fermented by marine *Pseudoalteromonas* strains. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 5, p. 2459–2468, 2021.

CAPÍTULO II

3.2 RESULTADOS II

3.2.1 Estabilidade térmica da protease bruta de *Bacillus* sp. CL18

A atividade ótima da protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 é observada a 50-62 °C e em pH 7,0-9,0 (RIEGER et al., 2017). Além das condições para máxima atividade, a avaliação da estabilidade de enzimas é importante considerando seus potenciais usos biotecnológicos (DE SIQUEIRA et al., 2014). Assim, a protease produzida no meio otimizado (FS30+MF5) foi submetida a testes de estabilidade térmica.

A inativação térmica da protease bruta foi avaliada em três temperaturas, na ausência de substrato enzimático (azocaseína). As pré-incubações (0-240 min) foram realizadas a 50,0, 52,5 e 55,0 °C em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0), com ou sem adição de 5 mM de CaCl₂. Após a pré-incubação (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240 min), a enzima bruta foi imediatamente colocada em banho de gelo para finalizar o efeito da temperatura. Posteriormente, a atividade proteolítica foi avaliada a 55 °C, pH 8,0, utilizando azocaseína como substrato. A atividade residual da protease (%) foi calculada com base na atividade sem pré-incubação (considerada como 100%).

Na ausência de íons cálcio, observou-se a inativação completa da enzima após 180, 150 e 90 min de incubação a 50,0, 52,5 e 55,0 °C, respectivamente (Fig. 1). A adição de Ca²⁺ (5 mM) aumentou notavelmente a estabilidade térmica da protease bruta. Após 240 min de incubação, nenhuma perda de atividade foi detectada a 50,0 °C, e a protease bruta apresentou >94% de sua atividade original a 52,5 °C; no entanto, apenas 7% da atividade inicial foi mantida a 55,0°C (Fig. 1).

A relevância de íons cálcio para a estabilidade térmica é amplamente reconhecida para serino-proteases bacterianas (DAOUD et al., 2017; HADDAR et al., 2010; HADJ-ALI et al., 2007; HAMMAMI et al., 2017), principais constituintes da protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 (RIEGER et al., 2017). O efeito positivo destes íons pode ser explicado pela ligação de Ca²⁺ a sítios específicos existentes nas serino-proteases, fortalecendo interações intramoleculares e reduzindo taxas de autólise (FAKHFAKH-ZOUARI et al., 2010; LERMEN et al., 2022).

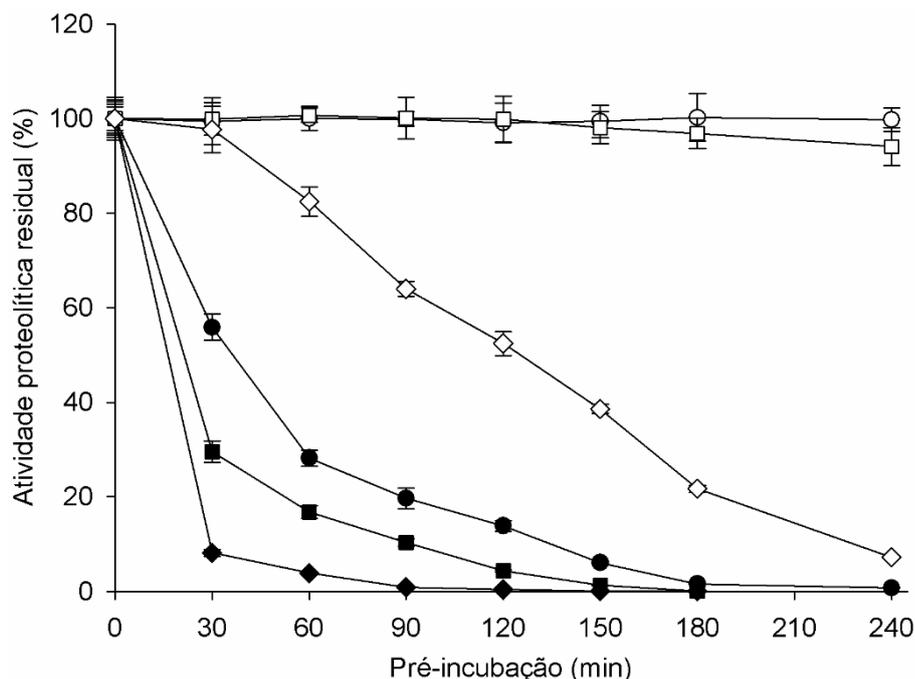


Figura 1 - Estabilidade térmica da protease bruta de *Bacillus* sp. CL18, após pré-incubação a 50 °C (círculos), 52,5 °C (quadrados) e 55 °C (losangos), na ausência (símbolos pretos) ou presença de 5 mM Ca²⁺ (símbolos brancos).

Os resultados deste experimento de estabilidade térmica (Fig. 1), somados à faixa ótima de temperatura para atividade enzimática (RIEGER et al., 2017), indicam que a protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 pode ser usada a 52,5 °C, na presença de íons cálcio (5 mM) como agentes de estabilização.

3.2.2 Uso da protease para produzir hidrolisados antioxidantes de PIS

A proteína isolada de soja (PIS) é um composto oriundo da farinha desengordurada de soja, onde está concentrada mais de 90% de proteínas, essa proteína de soja é composta por inúmeras macromoléculas de diversos tamanhos, densidades de cargas e diversas estruturas (LACERDA, 2008). Sendo assim, um excelente meio para obtenção de enzimas bioativas.

A hidrólise da PIS foi realizada em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de meio reacional. A PIS (10 g/L) foi adicionada de tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0, 5 mM Ca²⁺) e, após pré-incubação (52,5 °C, 20 min), a protease produzida por *Bacillus* sp. CL18 foi adicionada (2% v/v) para iniciar a hidrólise. As incubações ocorreram a 52,5 °C por até 4 h. Frascos em duplicata foram retirados em períodos definidos (0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min), e as reações finalizadas por fervura

(100 °C, 20 min). Após resfriamento e centrifugação (10.000 × g, 20 min), os sobrenadantes coletados corresponderam aos hidrolisados de PIS. Estes hidrolisados foram avaliados quanto ao teor de proteínas solúveis (LOWRY et al., 1951) e potencial antioxidante *in vitro*: (i) captura do radical ABTS (RE et al., 1999); (ii) captura do radical DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995); (iii) quelação de Fe²⁺ (CHANG; WU; CHIANG, 2007); e (iv) poder redutor (CHANG; WU; CHIANG, 2007).

Durante as incubações, observou-se incremento no teor de proteínas solúveis com a progressão do tempo, particularmente até os 180 min (Fig. 2), indicando a habilidade da protease em hidrolisar a PIS em peptídeos de menor massa (YIN; TONG; JIANG, 2005). A diminuição das taxas de hidrólise em função do tempo de incubação, representada pela menor liberação de proteínas solúveis ao longo do tempo (30-240 min), é comumente observada durante a hidrólise enzimática de proteínas (DOAN et al., 2020b; HUANG et al., 2020; MEZA-ESPINOZA et al., 2018), sugerindo a diminuição do número de ligações peptídicas hidrolisáveis, competição entre substratos intactos e produtos de hidrólise pelo sítio ativo de enzimas, e a própria desnaturação parcial da protease (CASTRO; SATO, 2014b; IBRAHIM; GHANI, 2020).

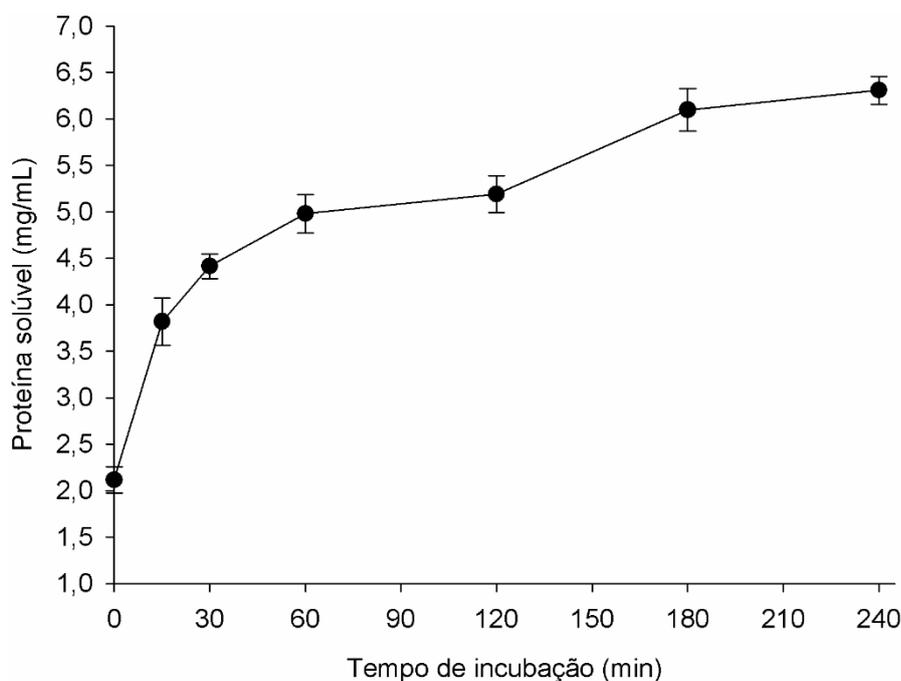


Figura 2 - Concentração de proteínas solúveis de hidrolisados de PIS, em função do tempo de incubação com a protease bruta de *Bacillus* sp. CL18.

O potencial antioxidante dos hidrolisados de PIS foi avaliado usando quatro ensaios, sendo dois deles baseados na eliminação de radicais (ABTS e DPPH). Os resultados demonstram o incremento da habilidade dos hidrolisados em inativar o radical ABTS em função do tempo de hidrólise (Fig. 3a). Particularmente, a capacidade de eliminação do radical ABTS foi elevada de 16% (0 min) para 61-64% (180-240 min). Logo, os peptídeos liberados pela ação da protease bruta apresentaram a habilidade em doar elétrons e estabilizar os radicais ABTS (DJELLOULI et al., 2021).

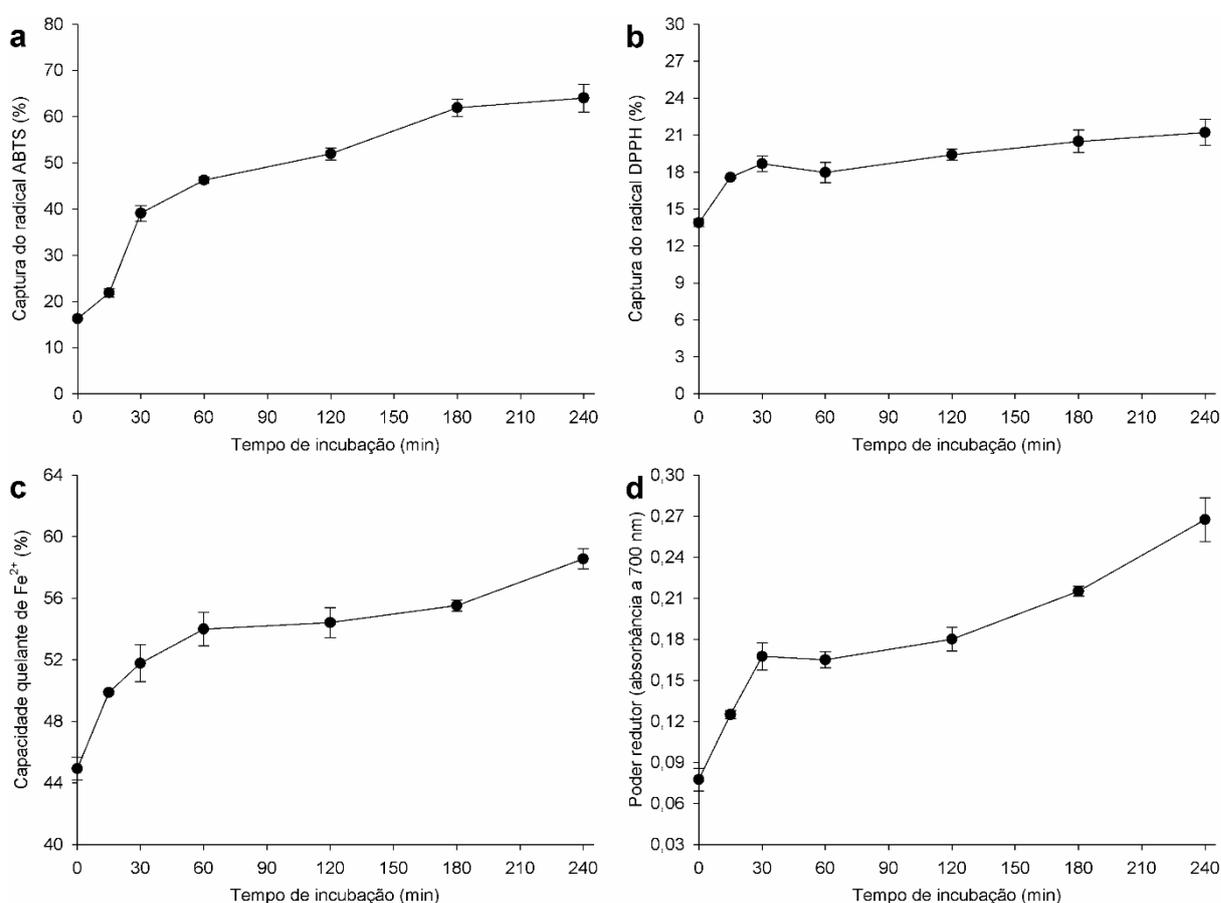


Figura 3 - Atividades antioxidantes de hidrolisados de PIS avaliadas através da captura dos radicais ABTS (a) e DPPH (b), quelação de Fe²⁺ (c) e redução de Fe³⁺ (d).

A hidrólise da PIS também resultou em incrementos quanto à captura do radical DPPH. Este radical sintético é estabilizado por moléculas capazes de doar elétrons, sendo este fenômeno mensurado pela diminuição da absorbância do radical a 517 nm (BRAND-WILLIAMS; CUEVELIER; BERSET, 1995). O potencial inicial de captura do radical DPPH (14%) foi incrementado para 20-21% após 180-

240 min de hidrólise (Fig. 3b). As diferenças de eliminação do radical DPPH (Fig. 3c), em relação à eliminação do radical ABTS (Fig. 3a) também são descritas por outros autores (CORRÊA et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2021), e podem estar relacionadas à presença de peptídeos com capacidades antioxidantes distintas.

No entanto, isto usualmente está associado às diferenças de solubilidade e difusividade destes radicais. Por exemplo, enquanto o radical ABTS é solúvel em meios aquosos e orgânicos, o radical DPPH só é solúvel nos últimos. Como os hidrolisados de PIS são soluções aquosas, os peptídeos hidrofílicos neles contidos podem reagir mais rapidamente com o radical ABTS, enquanto que o radical DPPH pode não difundir prontamente no meio aquoso (TANG et al., 2010).

No ensaio de quelação, os hidrolisados de PIS foram pré-incubados com Fe^{2+} (sulfato ferroso) e então o reagente ferrozina foi adicionado. A ferrozina reage com o Fe^{2+} , formando um complexo cuja absorbância é mensurada a 562 nm. A presença de agentes quelantes indisponibiliza o Fe^{2+} , impedindo que reaja com a ferrozina, de modo que a absorbância diminui (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). A Fig. 3c demonstra que a hidrólise da PIS também aumentou a capacidade dos hidrolisados obtidos em quelar Fe^{2+} . A partir dos 45% de quelação observados para a PIS não hidrolisada, as porcentagens atingiram 53-55% após 60-180 min, e as maiores atividades quelantes foram observadas após 240 min (58%).

O poder redutor, que descreve a capacidade de redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} , foi avaliado pelo método de redução do ferricianeto de potássio. Isto é verificado pela adição de Fe^{3+} (cloreto férrico) aos meios reacionais. Se o ferricianeto foi reduzido a ferrocianeto de potássio, este último reagirá com o Fe^{3+} adicionado, formando azul da Prússia, que é mensurado pela absorbância a 700 nm (Abs700). Deste modo, quando maior a absorbância, maior será o poder redutor (FAKHFAKH et al., 2011). Observou-se, por este experimento, que o poder redutor inicial (0,08 Abs700) foi elevado para 0,16-0,18 Abs700 após 30-120 min de hidrólise, com os maiores valores (0,26 Abs700) sendo detectados aos 240 min (Fig. 3d).

A proteína de soja, de elevada qualidade nutricional, ampla disponibilidade e baixo custo, é um substrato promissor para a obtenção de hidrolisados e peptídeos bioativos (ASHAOLU, 2020; CHATTERJEE; GLEDDIE; XIAO, 2018; KIM; YANG; KIM, 2021; SINGH; VIJ; HATI, 2014). Majoritariamente, a produção de hidrolisados bioativos de PIS é realizada usando enzimas proteolíticas comerciais (CHEN et al., 2020; DE CASTRO; SATO, 2015; JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2013; WANG et al., 2019).

Alguns estudos exploram proteases não-comerciais de origem vegetal para esta finalidade (MEZA-ESPINOZA et al., 2018; REYES JARA; LIGGIERI; BRUNO, 2018). Embora a prospecção de proteases microbianas alternativas às comerciais seja considerada promissora no que se refere à produção de hidrolisados proteicos bioativos (AGUILAR; SATO, 2018), poucos estudos reportam o uso de proteases não-comerciais obtidas de microrganismos para a hidrólise de PIS.

Deng et al. (2021) detectaram efeitos positivos sobre a atividade antioxidante, mensurada pela captura do radical DPPH e poder redutor, após a hidrólise de PIS (6 h) pela protease *Aspergillus oryzae* 3.042 (expressa em *Pichia pastoris*). A protease de *Bacillus* sp. MTCC 9558 também incrementou a atividade antioxidante da proteína de soja após hidrólises realizadas por até 6 h (PRASAD; NAIR, 2021). Hidrolisados de proteína de soja (5 mg/mL), obtidos com a protease de *Aspergillus oryzae* LBA 01 por 4 h, apresentaram maior captura do radical DPPH (69,2%) do que a proteína não hidrolisada (30,8%) (CASTRO; SATO, 2014b). Proteínas de soja também foram hidrolisadas usando a protease de *Paenibacillus elgii* TKU051. Após 4 h de hidrólise, a captura do radical DPPH foi elevada de 48% para 72% (LEE et al., 2021).

As atividades antioxidantes de hidrolisados de PIS, obtidos com a protease de *Chryseobacterium* sp. kr6, também foram avaliadas. A capacidade de captura do radical ABTS dos hidrolisados (50 mg/mL) foi elevada de 33,6% (0 h) para 81,1% (4 h); a eliminação do radical DPPH por estes hidrolisados (200 mg/mL) aumentou de 66,7% (0 h) para 78,8% (4 h); a quelação de Fe^{2+} dos hidrolisados (3,5 mg/mL) foi incrementada de 23,8% (0 h) para 61,1% (1 h), decrescendo depois para 22,5% (4 h); e o poder redutor dos hidrolisados (15 mg/mL) foi elevado de 0,099 Abs700 (0 h) para 0,249 Abs700 (4 h) (OLIVEIRA et al., 2014).

A hidrólise da proteína da soja por 6 h com a protease de *Streptomyces gedanensis* IFO 13427 incrementou o potencial antioxidante. Especificamente, os hidrolisados (40 mg/mL) apresentaram 70,5% de eliminação do radical DPPH, em comparação aos 36,2% da proteína de soja não hidrolisada, sendo que houve também incremento no poder redutor (RAHULAN et al., 2012). A hidrólise de PIS pela protease de *Chryseobacterium polytrichastri* ERM1:04 resultou em incrementos nos potenciais antioxidantes. Após 15 min de hidrólise, a captura de radicais ABTS e DPPH, a quelação de Fe^{2+} e o poder redutor foram elevados para

91,2%, 60,9%, 92,2% e 0,099 Abs700, a partir de valores iniciais de 11,0%, 3,2%, 1,9% e 0,0 Abs700 (MUKHIA; KUMAR; KUMAR, 2021).

Embora as bioatividades neste estudo sejam difíceis de comparar com aquelas apresentadas em investigações prévias, devido ao uso de diferentes ensaios e mesmo variações do mesmo ensaio (SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011), os resultados obtidos (Fig. 3) indicam que a protease de *Bacillus* sp. CL18 pode ser um interessante biocatalisador para a obtenção de hidrolisados antioxidantes a partir da PIS.

4 CONCLUSÃO

Escamas de peixe (FS) demonstraram ser o melhor substrato para a produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 em cultivos submersos e a suplementação do meio à base de FS com penas moídas (MF) aumentou os rendimentos enzimáticos. O uso de FS na obtenção de enzimas proteolíticas microbianas é pouco explorada, e a adição de MF às FS representa uma combinação de substratos não descrita até então.

Os sobrenadantes obtidos durante cultivos no meio otimizado exibiram, *in vitro*, atividades antioxidante, antidiabética e anti-hipertensiva superiores àquelas observadas no início dos cultivos, indicando a liberação de moléculas bioativas.

Portanto, proteases e hidrolisados bioativos são produtos interessantes que podem ser obtidos simultaneamente através do processamento microbiano de biomassas residuais abundantes e recalcitrantes. Tal abordagem representa uma estratégia promissora considerando tanto os problemas de descarte de resíduos quanto a possibilidade de agregar valor às escamas de peixes e penas de frango.

Além da produção, demonstrou-se uma potencial aplicação para a protease. A protease bruta foi capaz de hidrolisar PIS, e os hidrolisados resultantes apresentaram atividades antioxidantes *in vitro* demonstradas através da eliminação de radicais, quelação de Fe^{2+} e redução de Fe^{3+} , sendo estas capacidades superiores àquelas da PIS não hidrolisada.

A protease merece investigações quanto à atuação sobre outros substratos proteicos, visando a geração de hidrolisados bioativos. Estudos subsequentes também poderão focar na identificação de peptídeos bioativos a partir dos hidrolisados obtidos da bioconversão de FS e MF por *Bacillus* sp. CL18, bem como dos hidrolisados de PIS obtidos por catálise enzimática.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, J. G. DOS S.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253–262, 2018.
- AHMAD, W. et al. Optimization of Conditions for the Higher Level Production of Protease: Characterization of Protease from *Geobacillus* SBS-4S. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 12, p. 6613–6623, 2020.
- AKRAM, F.; HAQ, I. UL; JABBAR, Z. Production and characterization of a novel thermo- and detergent stable keratinase from *Bacillus* sp. NKSP-7 with perceptible applications in leather processing and laundry industries. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 371–383, 2020.
- ALAHYARIBEIK, S. et al. Bioconversion of chicken feather wastes by keratinolytic bacteria. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 135, p. 171–178, 2020.
- 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, n. 2, p. 143–152, 2013.
- ARYA, P. S. et al. **Understanding the Basis of Occurrence, Biosynthesis, and Implications of Thermostable Alkaline Proteases**. [s.l.] Springer US, 2021.
- ASHAOLU, T. J. Health Applications of Soy Protein Hydrolysates. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 4, p. 2333–2343, 2020.
- BABINI, E. et al. Microbial fermentation of industrial rice-starch byproduct as valuable source of peptide fractions with health-related activity. **Microorganisms**, v. 8, n. 7, p. 1–16, 2020.
- 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.
- BARBOSA, J. B. **Aproveitamento de soro de queijo e farinha de casca de maracujá para a produção de proteases e α -amilases por bacillus sp. SMIA-2**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)- Faculdade de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2011.
- BAQUEIRO-PEÑA, I. et al. Biotechnological potential of bacteria isolated from cattle environments of desert soils in Sonora Mexico. **World Journal of Microbiology and**

Biotechnology, v. 35, p. 4, 2019.

BARZKAR, N. Marine microbial alkaline protease: recent developments in biofilm n ideal choice for industrial application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1216–1229, 2020.

BASU, B. R.; BANIK, A. K.; DAS, M. Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB₁₀₀ grown on fish scale. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 449–455, 2008.

BEKHIT, A. A. et al. Exogenous Proteases for Meat Tenderization. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 8, p. 1012–1031, 2014.

BEN REBAH, F.; MILED, N. Fish processing wastes for microbial enzyme production: a review. **3 Biotech**, v. 3, n. 4, p. 255–265, 2013.

BERNARDO, B. DA S. et al. Co-production of proteases and bioactive protein hydrolysates from bioprocessing of feather meal. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, p. 1–9, 2019.

BEZUS, B. et al. Revalorization of chicken feather waste into a high antioxidant activity feather protein hydrolysate using a novel psychrotolerant bacterium. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 32, n. January, 2021.

BHAGWAT, P. K. et al. Use of statistical experimental methods for optimization of collagenolytic protease production by *Bacillus cereus* strain SUK grown on fish scales. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 28, p. 28226–28236, 2018.

BHATTACHERJEE, R. et al. Structural-genetic insight and optimization of protease production from a novel strain of *Aeromonas veronii* CMF, a gut isolate of *Chrysomya megacephala*. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 6, p. 2961–2977, 2021.

BIAŁKOWSKA, A. M. et al. The psychrotrophic yeast *Sporobolomyces roseus* LOCK 1119 as a source of a highly active aspartic protease for the in vitro production of antioxidant peptides. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 65, n. 5, p. 726–738, 2018.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**, v. 28, p. 25–30, 1995.

BRANDELLI, A., DAROIT, J.A., and CORRÊA, A.P.F. “Whey as a source of peptides with remarkable biological activities”, **Food Research International**, 73. 149-161. July 2015.

- CAHYANINGTYAS, H. A. A. et al. Optimization of protease production by *Bacillus cereus* HMRSC30 for simultaneous extraction of chitin from shrimp shell with value-added recovered products. **Environmental Science and Pollution Research**, n. 0123456789, 2021.
- CALLEGARO, K.; BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J. Beyond plucking: feathers bioprocessing into valuable protein hydrolysates. **Waste Management**, v. 95, p. 399–415, 2019.
- CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 58–65, 2014a.
- 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, n. 2, p. 317–328, 2014b.
- CAVELLO, I.; BEZUS, B.; CAVALITTO, S. The keratinolytic bacteria *Bacillus cytotoxicus* as a source of novel proteases and feather protein hydrolysates with antioxidant activities. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, p. 107, 2021.
- CORREA, Ana Paula Folmer. **Obtenção de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de caseinato ovino e soro de queijo ovino**. 2013. 92 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013
- CHALAMAIAH, M.; YU, W.; WU, J. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. **Food Chemistry**, v. 245, n. September 2017, p. 205–222, 2018.
- CHANG, C. Y.; WU, K. C.; CHIANG, S. H. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1537–1543, 2007.
- CHATTERJEE, C.; GLEDDIE, S.; XIAO, C. W. Soybean bioactive peptides and their functional properties. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 8–11, 2018.
- CHAUDHURI, M.; PAUL, A. K.; PAL, A. Production of an extracellular neutral protease by *Bacillus aerius* UB02 endophytic to carnivorous plant *Utricularia stellaris*. **Journal of Environmental Biology**, v. 42, p. 955–963, 2021.
- CHEN, C. et al. The chemistry behind the antioxidant actions of soy protein isolate

hydrolysates in a liposomal system: Their performance in aqueous solutions and liposomes. **Food Chemistry**, v. 323, n. December 2019, p. 126789, 2020.

CHEN, X. L. et al. Preparation and functional evaluation of collagen oligopeptide-rich hydrolysate from fish skin with the serine collagenolytic protease from *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

CLERICI, N. J.; LERMEN, A. M.; DAROIT, D. J. Agro-industrial by-products as substrates for the production of bacterial protease and antioxidant hydrolysates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 37, n. September, p. 102174, 2021.

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

CORRÊA, A. P. F. et al. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 12, 2011.

CORRÊA, A. P. F. et al. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. **Peptides**, v. 61, p. 48–55, 2014.

DAHIYA, S. et al. A review on biotechnological potential of multifarious enzymes in bread making. **Process Biochemistry**, v. 99, n. May, p. 290–306, 2020.

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

DANILOVA, I.; SHARIPOVA, M. The practical potential of Bacilli and their enzymes for industrial production. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1782, 2020.

DAOUD, L. et al. Characterization of thermo-solvent stable protease from *Halobacillus* sp. CJ4 isolated from Chott Eldjerid hypersaline lake in Tunisia. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, p. 104–113, 2017.

DAROIT, D. J. et al. Physicochemical properties and biological activities of ovine caseinate hydrolysates. **Dairy Science and Technology**, v. 92, n. 4, 2012.

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.; BRANDELLI, A. In vivo bioactivities of food protein-derived peptides – a current review. **Current Opinion in Food Science**, v. 39, p. 120–129, 2021.

DANILOVA, IULIJA, AND MARGARITA SHARIPOVA. "The practical potential of bacilli and their enzymes for industrial production." **Frontiers in microbiology** 11

(2020): 1782. Danilova, Iuliia, and Margarita Sharipova. "The practical potential of bacilli and their enzymes for industrial production." *Frontiers in microbiology* 11 (2020): 1782.

DE 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, n. 4, p. 694–702, 2015.

DE MENEZES, C. L. A. et al. Industrial sustainability of microbial keratinases: production and potential applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 1–17, 2021.

DE SIQUEIRA, A. C. R. et al. Peptidase with keratinolytic activity secreted by *Aspergillus terreus* during solid-state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 4, p. 514–522, 2014.

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

DELGADO-GARCÍA, M. et al. Bioprospection of proteases from *Halobacillus andaensis* for bioactive peptide production from fish muscle protein. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 39, p. 52–60, 2019.

DENG, J. J. et al. Recombinant neutral protease rNpl as fish feed additive to improve protein digestion and growth. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 1, p. 273–281, 2021.

DEVI, S. P.; JHA, D. K. Isolation of a lipolytic and proteolytic *Bacillus licheniformis* from refinery oily sludge and optimization of culture conditions for production of the enzymes. **Microbiology and Biotechnology Letters**, v. 48, n. 4, p. 515–524, 2020.

DHANDAPANI, B.; MAHADEVAN, S.; MUTHIAH, S. Conversion of Agro By-Products to an Alkaline Protease by *Aspergillus tamarii* and the Usefulness of Its Metabolic Heat for Better Process Understanding. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 6, p. 2623–2629, 2020.

DJELLOULI, M. et al. Hydrolysis of Shrimp Cooking Juice Waste for the Production of Antioxidant Peptides and Proteases by *Enterococcus faecalis* DM19. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 7, p. 3741–3752, 2021.

DOAN, C. T. et al. Microbial conversion of shrimp heads to proteases and chitin as an effective dye adsorbent. **Polymers**, v. 12, n. 10, p. 1–16, 2020a.

DOAN, C. T. et al. Utilization of Seafood Processing By-Products for Production of Proteases by *Paenibacillus* sp. TKU052 and Their Application in Biopeptides'

Preparation. **Marine drugs**, v. 18, 2020b.

DOMÍNGUEZ, R. et al. A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. **Antioxidants**, v. 8, n. 10, p. 1–31, 2019.

DUARTE NETO, J. M. W. et al. Optimization of *Penicillium aurantiogriseum* protease immobilization on magnetic nanoparticles for antioxidant peptides' obtainment. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 7, p. 644–654, 2017.

EL-GAYAR, K. E.; ESSA, A. M.; ABADA, E. A. Whey fermentation for protease production using *Bacillus thuringiensis* isolated from mangrove rhizosphere soil in Jazan, Saudi Arabia. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 29, n. 3, p. 2167–2176, 2020.

ELLOUZ, Y. et al. Production of protease by *Bacillus subtilis* grown on sardinelle heads and viscera flour. **Bioresource Technology**, v. 80, n. 1, p. 49–51, 2001.

EMBIRIEKAH, S. M. et al. Comparative analysis of functionality of spray dried whey protein hydrolysates obtained by enzymatic and microbial hydrolysis. n. November 2017, p. 265–274, 2018.

EMRAN, M. A.; ISMAIL, S. A.; HASHEM, A. M. Production of detergent stable thermophilic alkaline protease by *Bacillus licheniformis* ALW1. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, p. 101631, 2020.

ESAKKIRAJ, P. et al. Evaluation of protease-producing ability of fish gut isolate *Bacillus cereus* for aqua feed. **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, n. 4, p. 383–390, 2009.

FAKHFAKH-ZOUARI, N. et al. 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, n. 5, p. 617–626, 2010.

FAKHFAKH, N. et al. Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 9, p. 1731–1737, 2011.

FANG, B. et al. Conversion of turbot skin wastes into valuable functional substances with an eco-friendly fermentation technology. **Journal of Cleaner Production**, v. 156, p. 367–377, 2017.

FERRAREZE, P. A. G.; CORREA, 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.

GAO, J. et al. Identification and antihypertension study of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from the skirt of *Chlamys farreri* fermented with *Bacillus natto*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 1, p. 146–158, 2021.

GAONKAR, S. K.; FURTADO, I. J. Valorization of low-cost agro-wastes residues for the maximum production of protease and lipase haloextremozymes by *Haloferax lucentensis* GUBF-2 MG076078. **Process Biochemistry**, v. 101, n. June 2020, p. 72–88, 2021.

GHORBEL-BELLAAJ, O. et al. Fermented shrimp waste hydrolysates: promising source of functional molecules with antioxidant properties. **Journal of Culinary Science and Technology**, v. 16, n. 4, p. 357–377, 2018.

GIMENES, N. C.; SILVEIRA, E.; TAMBOURGI, E. B. An overview of proteases: production, downstream processes and industrial applications. **Separation and Purification Reviews**, v. 50, n. 3, p. 223–243, 2021.

GIOPPO, N. M. DA R. et al. Influence of the carbon and nitrogen sources on keratinase production by *Myrothecium verrucaria* in submerged and solid state cultures. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 705–711, 2009.

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

GUPTA, R. K. et al. Scale-up of an alkaline protease from *Bacillus pumilus* MTCC 7514 utilizing fish meal as a sole source of nutrients. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 1230–1236, 2012.

HADDAR, A. et al. Characterization of detergent stable and feather degrading serine proteases from *Bacillus mojavenis* A21. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, n. 1–2, p. 53–63, 2010.

HADJ-ALI, N. EL et al. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 515–523, 2007.

HAMIN NETO, Y. A. A.; ROSA, J. C.; CABRAL, H. Peptides with antioxidant properties identified from casein, whey, and egg albumin hydrolysates generated by two novel fungal proteases. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 49,

p. 639–648, 2019.

HAMMAMI, A. et al. 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.

HARIKRISHNA, N. et al. Fish scales as potential substrate for production of alkaline protease and amino acid rich aqua hydrolyzate by *Bacillus altitudinis* GVC11. **Indian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 339–343, 2017.

HASSAN, M. A. et al. Comprehensive insights into microbial keratinases and their implication in various biotechnological and industrial sectors: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 567–583, 2020.

HE, F. et al. Optimization of fermentation conditions for production of neutral metalloprotease by *Bacillus subtilis* SCK6 and its application in goatskin-dehairing. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 2021.

HE, H.-L. et al. Preparation and functional evaluation of oligopeptide-enriched hydrolysate from shrimp (*Acetes chinensis*) treated with crude protease from *Bacillus* sp. SM98011. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 3, p. 385–390, 2006.

HIDALGO, M. E. et al. Physicochemical and antioxidant properties of bovine caseinate hydrolysates obtained through microbial protease treatment. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 3, p. 342–352, 2012.

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

HOU, Y. et al. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 24, 2017.

HUANG, Y. et al. Production of yeast hydrolysates by *Bacillus subtilis* derived enzymes and antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. **Food Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 262–281, 2020.

HWANG, C. F. et al. Antioxidant and antibacterial activities of peptide fractions from flaxseed protein hydrolysed by protease from *Bacillus altitudinis* HK02. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 3, p. 681–689, 2016.

IBRAHIM, E. S. K.; GHANI, M. A. The effect of enzymatic hydrolysis on the antioxidant activities and amino acid profiles of defatted chia (*Salvia hispanica* L .)

flour. **Food Research**, v. 4, p. 38–50, 2020.

JEMIL, I. et al. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 6, p. 963–972, 2014.

JIMÉNEZ-RUIZ, E. I. et al. Partial characterization of ultrafiltrated soy protein hydrolysates with antioxidant and free radical scavenging activities. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 8, 2013.

KALAIKUMARI, S. S. et al. 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.

KAUR, S. P.; AZMI, W. Cost Effective Production of a Novel Collagenase from a Non-Pathogenic Isolate *Bacillus tequilensis*. **Current Biotechnology**, v. 2, p. 17–22, 2013.

KEHINDE, B. A.; SHARMA, P. Recently isolated antidiabetic hydrolysates and peptides from multiple food sources: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 2, p. 322–340, 2020.

KIM, I. S.; YANG, W. S.; KIM, C. H. Beneficial effects of soybean-derived bioactive peptides. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 1–23, 2021.

KOCABAŞ, D. S.; LYNE, J.; USTUNOL, Z. Hydrolytic enzymes in the dairy industry: Applications, market and future perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 119, n. December 2021, p. 467–475, 2021.

KUMURA, H.; ISHIDO, T.; SHIMAZAKI, K. Production and partial purification of proteases from *Aspergillus oryzae* grown in a medium based on whey protein as an exclusive nitrogen source. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 2, p. 657–667, 2011.

LACERDA, LIZIANE DANTAS. **AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA, AMIDO E GLÚTEN E SUAS MISTURAS**. 2008. 91 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

- LACROIX, I. M. E.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived dipeptidyl-peptidase IV inhibitors as a potential approach for glycemic regulation - Current knowledge and future research considerations. **Trends in Food Science and Technology**, v. 54, p. 1–16, 2016.
- LEE, D. H. et al. Proteases production and chitin preparation from the liquid fermentation of chitinous fishery by-products by *paenibacillus elgii*. **Marine Drugs**, v. 19, n. 9, 2021.
- LERMEN, A. M. et al. Characterization and application of a crude bacterial protease to produce antioxidant hydrolysates from whey protein. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, 2022.
- LORENZO, J. M. et al. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 79, n. July, p. 136–147, 2018.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.
- MANZOOR, M.; SINGH, J.; GANI, A. Exploration of bioactive peptides from various origin as promising nutraceutical treasures: In vitro, in silico and in vivo studies. **Food Chemistry**, v. 373, n. September 2021, 2022.
- 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**, v. 59, n. 8, p. 1264–1283, 2019.
- MARTINS, V. G. et al. Protein and Amino Acid Solubilization using *Bacillus cereus*, *Bacillus velezensis*, and *Chryseobacterium* sp. from Chemical Extraction Protein Residue. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 1, p. 116–123, 2011.
- MARUTHIAH, T. et al. Deproteinization potential and antioxidant property of haloalkalophilic organic solvent tolerant protease from marine *Bacillus* sp. APCMST-RS3 using marine shell wastes. **Biotechnology Reports**, v. 8, p. 124–132, 2015.
- MARUTHIAH, T.; PALAVESAM, A. Characterization of haloalkalophilic organic solvent tolerant protease for chitin extraction from shrimp shell waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 552–560, 2017.
- MATKAWALA, F. et al. Microbial alkaline serine proteases: Production, properties and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 1–12, 2021.

- MECHRI, S. et al. A biological clean processing approach for the valorization of speckled shrimp *Metapenaeus monoceros* by-product as a source of bioactive compounds. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 13, p. 15842–15855, 2020.
- MEZA-ESPINOZA, L. et al. 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.
- MHINA, C. F.; JUNG, H. Y.; KIM, J. K. Recovery of antioxidant and antimicrobial peptides through the reutilization of Nile perch wastewater by biodegradation using two *Bacillus* species. **Chemosphere**, v. 253, p. 126728, 2020.
- 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, n. 2018, p. 493–522, 2018.
- MOONNEE, Y. A. et al. Keratinolytic protease from *Pseudomonas aeruginosa* for leather skin processing. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, 2021.
- MORABANDZA, C. J. et al. Optimization of culture conditions for protease production using three strains of bacillus. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 621–629, 2021.
- MUKHIA, S.; KUMAR, A.; KUMAR, R. Generation of antioxidant peptides from soy protein isolate through psychrotrophic *Chryseobacterium* sp. derived alkaline broad temperature active protease. **Lwt**, v. 143, n. October 2020, 2021.
- NASCIMENTO, T. C. E. S. et al. Antarctic fungus proteases generate bioactive peptides from caseinate. **Food Research International**, v. 139, n. June 2020, 2021.
- NASRI, R. et al. Fermented protein hydrolysates: biological activities and applications. **Current Opinion in Food Science**, v. 43, p. 120–127, 2022.
- NNOLIM, N. E.; NWODO, U. U. *Bacillus* sp. CSK2 produced thermostable alkaline keratinase using agro-wastes: keratinolytic enzyme characterization. **BMC Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1–14, 2020.
- NWACHUKWU, I. D.; ALUKO, R. E. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, p. e12761, 2019.
- OLIVEIRA, C. F. et al. 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, 2014.

OLIVEIRA, C. F. DE et al. Soy protein hydrolysis with microbial protease to improve antioxidant and functional properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 5, p. 2668–2678, 2015.

OLIVEIRA, C. T. DE et al. Screening of bacteria for protease production and feather degradation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 7, n. 3, p. 447–453, 2016.

ORTIZ, G. E. et al. A Comparative Study of New *Aspergillus* Strains for Proteolytic Enzymes Production by Solid State Fermentation. **Enzyme Research**, v. 2016, 2016.

PADMAPRIYA, Muthu; WILLIAMS, B. Christudhas. Purification and characterization of neutral protease enzyme from *Bacillus subtilis*. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 2, n. 4, p. 612-618, 2012.

PAL, K. et al. Microbial decomposition of crustacean shell for production of bioactive metabolites and study of its fertilizing potential. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 42, p. 58915–58928, 2021.

PAN, M. H. et al. Purification and characterization of a fish scale-degrading enzyme from a newly identified *Vogesella* sp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 23, p. 12541–12546, 2010.

PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F. Biotechnological approaches for the value addition of whey. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 327–348, 2012.

PATEL, A. R. et al. Production optimisation and characterisation of extracellular protease secreted by newly isolated *Bacillus subtilis* AU-2 strain obtained from *Tribolium castaneum* gut. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, n. January, p. 101122, 2019.

PÉREZ, Y. A. et al. Antihypertensive and antioxidant properties from whey protein hydrolysates produced by encapsulated *Bacillus subtilis* cells. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 25, n. 2, p. 681–689, 2019.

PERNA, A. et al. Hydrolytic degree and antioxidant activity of purified casein characterised by different haplotypes (α s1-, β - and k-casein) after enzymatic hydrolysis with pepsin and enzymatic extract from *Pleurotus eryngii*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 5, p. 2020–2028, 2020

PHILANTO, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. **Int Dairy J** 16(11):1306–1314.

- POURMOHAMMADI, K.; ABEDI, E. Hydrolytic enzymes and their directly and indirectly effects on gluten and dough properties: An extensive review. **Food Science and Nutrition**, v. 9, n. 7, p. 3988–4006, 2021.
- POWER, O.; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R. J. Antioxidative peptides: Enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. **Amino Acids**, v. 44, n. 3, p. 797–820, 2013.
- PRAJAPATI, S.; KOIRALA, S.; ANAL, A. K. Bioutilization of chicken feather waste by newly isolated keratinolytic bacteria and conversion into protein hydrolysates with improved functionalities. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2021.
- PRASAD, R.; NAIR, A. J. Production and characterization of bioactive peptides by purified protease isolated from bacillus sp. Mtcc 9558. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 15, n. 5, p. 419–424, 2021.
- RAHULAN, R. et al. Aminopeptidase from *Streptomyces gedanensis* as a useful Tool for Protein Hydrolysate Preparations with Improved Functional Properties. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 7, p. 791–797, 2012.
- RAKSHIT, S. et al. Extraction of chitin from *Litopenaeus vannamei* shell and its subsequent characterization: an approach of waste valorization through microbial bioprocessing. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 9, p. 1943–1956, 2021.
- RAJAGOPALAN, G. AND KRISHNAN, C. (2008) Alpha-Amylase Production from Catabolite Derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 Utilizing Sugarcane Bagasse Hydrolysate. **Bioresource Technology**, 99, 3044-3050. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.001>
- RAY, A.K.; GHOSH, K.; RINGØ, E.. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. **Aquaculture Nutrition**, [S.L.], v. 18, n. 5, p. 465-492, 20 abr. 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x>.
- RAVEENDRAN, S. et al. Applications of microbial enzymes in food industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 16–30, 2018.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.
- REYES JARA, A. M.; 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, n. October 2017, p. 326–333, 2018.

- RIEGER, T. J. et al. Proteolytic system of *Bacillus* sp. CL18 is capable of extensive feather degradation and hydrolysis of diverse protein substrates. **British Poultry Science**, v. 58, n. 3, 2017.
- ROCHÍN-MEDINA, J. J. et al. Use of whey as a culture medium for *Bacillus clausii* for the production of protein hydrolysates with antimicrobial and antioxidant activity. **Food Science and Technology International**, v. 24, n. 1, p. 35–42, 2018.
- RYAN, J. T. et al. Bioactive peptides from muscle sources: Meat and fish. **Nutrients**, v. 3, n. 9, p. 765–791, 2011.
- SAHOO, A. et al. Nattokinase production from *Bacillus subtilis* using cheese whey: effect of nitrogen supplementation and dynamic modelling. **Journal of Water Process Engineering**, v. 38, p. 101533, 2020.
- 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.
- SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949–1956, 2010.
- SATHISHKUMAR, R.; ANANTHAN, G.; RAGHUNATHAN, C. Production and characterization of haloalkaline protease from ascidian-associated *Virgibacillus halodenitrificans* RSK CAS1 using marine wastes. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1481–1493, 2015.
- SELLAMI-KAMOUN, A. et al. Enhanced *Bacillus cereus* BG1 protease production by the use of sardinelle (*Sardinella aurita*) powder. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 273–280, 2011.
- SENGUPTA, S. et al. Characterization of thermoadaptive serine metalloprotease and application in waste management. **Bioresource Technology Reports**, v. 2, p. 53–61, 2018.
- SHARMA, I.; KANGO, N. Production and characterization of keratinase by *Ochrobactrum intermedium* for feather keratin utilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 1046–1056, 2021.
- SHARMA, K. M. et al. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 115–126, 2017.

- SHARMA, M. et al. 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.
- SINGH, P.; SINGH, T. PAL; GANDHI, N. Prevention of lipid oxidation in muscle foods by milk proteins and peptides: A review. **Food Reviews International**, v. 34, p. 226–247, 2018.
- SINGH, S.; BAJAJ, B. K. Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. **Energy, Ecology and Environment**, v. 2, n. 6, p. 370–386, 2017.
- SOLANKI, P. et al. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. **3 Biotech**, v. 11, p. 428, 2021.
- SOUISSI, N. et al. Preparation and use of media for protease-producing bacterial strains based on by-products from Cuttlefish (*Sepia officinalis*) and wastewaters from marine-products processing factories. **Microbiological Research**, v. 163, n. 4, p. 473–480, 2008.
- SRIVASTAVA, B. et al. Microbial keratinases: An overview of biochemical characterization and its eco-friendly approach for industrial applications. **Journal of Cleaner Production**, v. 252, p. 119847, 2020.
- SUGANTHI, S. H.; RAMANI, K. Microbial assisted industrially important multiple enzymes from fish processing waste: Purification, characterization and application for the simultaneous hydrolysis of lipid and protein molecules. **RSC Advances**, v. 6, n. 96, p. 93602–93620, 2016.
- SULEIMAN, A. D. et al. Effect of cultural conditions on protease production by a thermophilic *Geobacillus thermoglucosidasius* SKF4 isolated from Sungai klah hot spring park, Malaysia. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 1–14, 2020.
- SUMANTHA, A., LARROCHE, C., & PANDEY, A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: **A perspective. Food Technology and Biotechnology**, 44(2), 211–220.
- TANG, X. et al. Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 587–593, 2010.
- TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1–11, 2013.

- TAVANO, O. L. et al. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, p. 412–436, 2018.
- THU, N. T. A. et al. Characterizations and Fibrinolytic Activity of Serine Protease from *Bacillus subtilis* C10. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 110–116, 2020.
- TOLDRÁ, F. et al. Recent Progress in Enzymatic Release of Peptides in Foods of Animal Origin and Assessment of Bioactivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 46, p. 12842–12855, 2020.
- TOVAR-JIMÉNEZ, X. et al. Antioxidant and antihypertensive activity of bovine whey protein concentrate enzymatic hydrolysates. **Biotecnia**, v. 23, p. 161–169, 2021.
- TRIKI-ELLOUZ, Y. et al. Biosynthesis of protease by *Pseudomonas aeruginosa* MN7.pdf. p. 41–45, 2003.
- ULUG, S. K.; JAHANDIDEH, F.; WU, J. Novel technologies for the production of bioactive peptides. **Trends in Food Science and Technology**, v. 108, n. November 2020, p. 27–39, 2021.
- VAN DIJL, J. M.; HECKER, M. *Bacillus subtilis*: From soil bacterium to super-secreting cell factory. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 1–6, 2013.
- VAN DER MAAREL, Marc JEC et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 137-155, 2002
- WANG, L. et al. Production and characterization of keratinolytic proteases by a chicken feather-degrading Thermophilic strain, *thermoactinomyces* sp. YT06. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 2190–2198, 2017.
- WANG, R. et al. Preparation of bioactive peptides with antidiabetic, antihypertensive, and antioxidant activities and identification of α -glucosidase inhibitory peptides from soy protein. **Food Science and Nutrition**, v. 7, n. 5, p. 1848–1856, 2019.
- WANG, Y. K. et al. Production of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides by fermentation of marine shrimp *Acetes chinensis* with *Lactobacillus fermentum* SM 605. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 5, p. 785–791, 2008.
- XIE, F. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* 35 M can exclusively produce and secrete proteases when cultured in soybean-meal-based medium. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 209, n. P2, p. 112188, 2022.

YIN, L.-J.; TONG, Y.-L.; JIANG, S.-T. Improvement of the functionality of minced Mackerel by hydrolysis and subsequent lactic acid bacterial fermentation. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 3, p. M172–M178, 2005.

ZHANG, Y. et al. Fermentation conditions of serine/alkaline milk-clotting enzyme production by newly isolated *Bacillus licheniformis* BL312. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 1289–1300, 2019.

ZOU, Y. et al. Bioactivity screening of hydrolysates from brown crab processing side streams fermented by marine *Pseudoalteromonas* strains. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 5, p. 2459–2468, 2021.

KASANA, Ramesh Chand; SALWAN, Richa; YADAV, Sudesh Kumar. Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. **Critical Reviews In Microbiology**, [S.L.], v. 37, n. 3, p. 262-276, 21 maio 2011. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/1040841x.2011.577029>.

KAMAL, Shagufta; REHMAN, Saima; IQBAL, Hafiz M. N.. Biotechnological valorization of proteases: from hyperproduction to industrial exploitation-a review. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 511-522, 26 ago. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ep.12447>.

KEHINDE, BABABODE ADESEGUN, AND POORVA SHARMA. "Recently isolated antidiabetic hydrolysates and peptides from multiple food sources: **A review.**" **Critical reviews in food science and nutrition** 60.2 (2020): 322-340.

KOHLMANN, K.L.; NIELSEN, S.s.; STEENSON, L.R.; LADISCH, M.R.. Production of Proteases by Psychrotrophic Microorganisms. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 74, n. 10, p. 3275-3283, out. 1991. American Dairy Science Association. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(91\)78513-5](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(91)78513-5).

KOCABAŞ, DIDEM SUTAY; LYNE, JOHN; USTUNOL, ZEYNEP. Hydrolytic enzymes in the dairy industry: Applications, market and future perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, 2021.

KUMAR, C.G., TAKAGI, H. (1999) Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**. 17:561-594.

KUMURA, H.; ISHIDO, T.; SHIMAZAKI, K.. Production and partial purification of proteases from *Aspergillus oryzae* grown in a medium based on whey protein as an exclusive nitrogen source. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 94, n. 2, p. 657-667, fev. 2011. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3587>.