



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Câmpus de São José do Rio Preto

JOSÉ ERICK GALINDO GOMES

Avaliação das atividades biológicas de peptídeos liberados a partir  
da hidrólise da caseína caprina por proteases sintetizadas por  
fungos filamentosos

São José do Rio Preto  
2018

JOSÉ ERICK GALINDO GOMES

Avaliação das atividades biológicas de peptídeos liberados a partir  
da hidrólise da caseína caprina por proteases sintetizadas por  
fungos filamentosos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Processo:  
2014/13700-3

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Keila Aparecida  
Moreira

São José do Rio Preto  
2018

Gomes, José Erick Galindo.

Avaliação das atividades biológicas de peptídeos liberados a partir da hidrólise da caseína caprina por proteases sintetizadas por fungos filamentosos / José Erick Galindo Gomes. -- São José do Rio Preto, 2018  
240 f. : il.

Orientador: Roberto da Silva

Coorientador: Keila Aparecida Moreira

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Hidrólise. 3. Caseína 4. Peptídeos 5. Fungos filamentosos. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 582.28

## JOSÉ ERICK GALINDO GOMES

### Avaliação das atividades biológicas de peptídeos liberados a partir da hidrólise da caseína caprina por proteases sintetizadas por fungos filamentosos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Processo:  
2014/13700-3

#### Comissão Examinadora

Prof. Dr. Roberto da Silva  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto  
Orientador

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior  
USP – São Paulo

Prof. Dr. Richard John Ward  
USP – Ribeirão Preto

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Neuza Jorge  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
23 de março de 2018

*Aos meus pais, Margarethe e José Cícero (in memoriam),  
que sempre me deram apoio incondicional em todas as  
etapas da minha vida e nunca mediram  
esforços para a minha educação.  
Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por todas as oportunidades concedidas e pela força para superar os obstáculos e ultrapassar as barreiras impostas ao longo do percurso.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela oportunidade e apoio concedido, fornecendo todo apoio estrutural e educacional. Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, por fornecer um excelente nível de conhecimentos e possuir um corpo docente comprometido com a formação de mestres e doutores.

A agência de fomento CAPES pela concessão inicial da bolsa de pós-graduação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de pós-graduação em nível de doutorado (Processo nº 2014/13700-3) e pela concessão da Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior – BEPE (Processo nº 2016/10289-6).

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto da Silva, por ter me aceitado como seu aluno, depositado em mim sua plena confiança e compartilhado seus ensinamentos ao longo destes quatro anos.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Keila Aparecida Moreira, que me acompanha desde a graduação como minha orientadora de iniciação científica, estágio curricular e mestrado. Que sempre me deu apoio e oportunidades para chegar onde eu cheguei e foi de fundamental importância nesta conquista.

À minha supervisora de estágio no exterior, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Manuela Estevez Pintado, que me recebeu de braços abertos e me deu todo suporte para realização de parte da minha pesquisa, junto com a Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa em Porto – Portugal.

Aos professores da banca do Exame de Qualificação, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Barretto Penna e Prof. Dr. Gustavo Bonilla.

Aos professores da banca de defesa do Doutorado, por suas contribuições.

A minha família, em especial a minha Mãe e minha irmã Graziela, por sempre me apoiarem em minhas decisões de vida, tanto profissional, quanto pessoal, estando ao meu lado em todos os momentos. E ao meu sobrinho Diego Miguel, um presente dado por Deus que após o seu nascimento, renovou minhas forças quase esgotadas.

A Rodolfo, por todo amor, carinho, companheirismo, compreensão e apoio nos momentos mais difíceis.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eleni Gomes, por compartilhar toda estrutura do laboratório sem medir esforços para a realização deste trabalho, junto com todas as boas conversas na hora do cafezinho.

À minha grande amiga Íris Brunet, que foi imprescindível no caminho e na conquista deste título.

A todos os meus colegas de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Ibilce-UNESP. Em especial aos grandes amigos que fiz ao longo desse período e que levarei para sempre: Isabel, Josiani, Pedro, Diego, Carol, Janaína, Angélica, Gabriela e Erik.

Às minhas amigas “brasucas” que fiz durante minha estadia em Portugal, verdadeiros presentes que deixaram minha vida mais alegre e leve durante esta etapa: Giovania, Glenise, Adriana, Fernanda e Cristiane.

Aos queridos amigos do “Besta Fera Origens - AP 275” que dividiram comigo durante um longo ano em Portugal, tanto os momentos tristes, quanto os felizes e me fizeram dar boas gargalhadas: Larissa, Ítalo, Marcelo, Rafael e Anderson.

Aos amigos do coração que sempre estiveram comigo, longe ou perto: Camila, Patrícia, Gualberto e Rosângela.

*“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”*

*Antoine de Saint-Exupéry*

## ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DA TESE

Esta tese está organizada em seis capítulos para melhor distribuição e entendimento do assunto abordado. Um **Resumo** geral do trabalho foi inicialmente colocado, para orientar o leitor sobre a relevância e principais resultados obtidos no trabalho. Finalmente, após as seções de capítulos, uma seção de **Considerações finais** apresenta uma análise dos principais resultados e as conclusões obtidas no presente trabalho. **Capítulo I)** Procurou demonstrar a relevância científica e o estado da arte do tema abordado no trabalho e os objetivos almejados. A revisão, descreveu a estrutura e características da caseína; a ação das peptidases microbianas; a funcionalidade dos peptídeos quanto a suas propriedades biológicas e alguns problemas relacionados a eles. **Capítulo II)** Foram avaliados diferentes espécies de fungos filamentosos produtores de proteases com potencial para liberar peptídeos com atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-hipertensiva. **Capítulo III)** Descreveu-se a produção, purificação, caracterização bioquímica e termodinâmica da serina protease extracelular do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133. **Capítulo IV)** Descreveu-se a produção, purificação, caracterização bioquímica e termodinâmica da serina protease extracelular, do fungo filamentoso *Mucor guilliermondii* URM 5848. **Capítulo V)** Avaliou-se as atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-hipertensiva, dos peptídeos obtidos da hidrólise da caseína caprina a partir da serina protease purificada, sintetizada pelo fungo *M. subtilissimus* URM 4133. **Capítulo VI)** Foram avaliadas as mesmas atividades biológicas do capítulo anterior para os peptídeos provenientes da hidrólise da caseína caprina a partir da serina protease purificada, sintetizada pelo fungo filamentoso *M. guilliermondii* URM 5848. Todos os capítulos foram redigidos na forma de artigos científicos a serem submetidos, após correções e traduções ao inglês, a publicações em periódicos internacionais.

## RESUMO

Peptídeos bioativos são moléculas de origem natural que podem auxiliar funções fisiológicas nos organismos. O presente estudo teve por objetivo produzir proteases por diferentes fungos filamentosos, hidrolisar a caseína caprina e avaliar o potencial de atividades biológicas dos peptídeos liberados. Baseado nos resultados de grau de hidrólise (GH), que variou entre 33,59% e 71,81% e nas atividades biológicas, os fungos *Mucor subtilissimus* URM 4133 e *Mucor guilliermondii* URM 5848 foram escolhidos para dar continuidade ao trabalho. Para a purificação de ambas as enzimas foi utilizado inicialmente um planejamento fatorial  $2^4$ , com o intuito de verificar as melhores condições de produção enzimática. A atividade da protease foi máxima em pH 8,5 a 45 °C, para o *M. subtilissimus* URM 4133 e em pH 8,0 a 40 °C para a enzima do *M. guilliermondii* URM 5848; entretanto, permaneceram estáveis em praticamente toda faixa de pH e termoestáveis até 40°C e 45 °C, respectivamente. Ambas as proteases foram completamente inibidas pelo fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF). As proteases purificadas de ambos os fungos foram utilizadas separadamente para hidrolisar a caseína caprina. Os hidrolisados obtidos no tempo de 12 horas apresentaram melhores resultados gerais de atividades biológicas tanto para a protease do fungo *M. subtilissimus* URM 4133, quanto para a protease do fungo *M. guilliermondii* URM 5848. A atividade anti-hipertensiva apresentou resultados de 92,57% e de 83,42% para a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA). Dentre as frações separadas em FLPC a fração P5 (URM 4133) e a fração P3 (URM 5848) apresentaram um  $IC_{50}$  de atividade anti-hipertensiva de 35,42 e 22,97  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Os peptídeos liberados foram eficientes para desempenhar todas as atividades biológicas propostas, com destaque para a inibição da enzima ECA, o que mostrou o potencial destas moléculas em auxiliar no controle da pressão arterial.

Palavras-chave: Tecnologia de alimentos; Hidrólise; Caseína; Peptídeos; Fungos filamentosos

## **ABSTRACT**

*Bioactive peptides are molecules of natural origin that can aid physiological functions in organisms. The present study aimed to produce proteases by different filamentous fungi, to hydrolyze caprine casein and to evaluate the potential of biological activities of the released peptides. Based on the results of hydrolysis degree (GH), which varied between 33.59% and 71.81% and in biological activities, the fungi *Mucor subtilissimus* URM 4133 and *Mucor guilliermondii* URM 5848 were chosen to continue the work. For the purification of both enzymes, a factorial design  $2^4$  was used, in order to verify the best conditions of enzymatic production. Protease activity was maximal at pH 8.5 at 45 °C for *M. subtilissimus* URM 4133 and at pH 8.0 at 40 °C for the *M. guilliermondii* URM 5848 enzyme; however, remained stable in practically every pH range and thermostable up to 40 °C and 45 °C, respectively. Both proteases were completely inhibited by phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF). Purified proteases from both fungi were used separately to hydrolyze caprine casein. The hydrolysates obtained in the time of 12 hours presented better general results of biological activities both for the protease of the fungus *M. subtilissimus* URM 4133 and for the protease of the fungus *M. guilliermondii* URM 5848. The antihypertensive activity presented results of 92.57 % and 83.42% for inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE). Among the fractions separated in FLPC, the fraction P5 (URM 4133) and the fraction P3 (URM 5848) presented an  $IC_{50}$  of antihypertensive activity of 35.42 and 22.97  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. The peptides released were efficient to perform all the proposed biological activities, with emphasis on the inhibition of the enzyme ACE, which showed the potential of these molecules to assist in the control of blood pressure.*

*Keywords: Food Technology; Hydrolysis; Casein; Peptides; Filamentous fungi*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Capítulo I:

- Figura 1** – Frações, submicela e micela de caseína. Fonte: Faria (2011).....34
- Figura 2** – Classificação de proteases de acordo com sua região de catálise. Fonte: Moffitt et al. (2010).....36
- Figura 3** – Modelo *barrel stave* de atividade antimicrobiana. Fonte: Brogden (2005).....43
- Figura 4** – Modelo *carpet* de atividade antimicrobiana. Fonte: Brogden (2005).....44
- Figura 5** – Modelo *toirodal* de atividade antimicrobiana. Fonte: Brogden (2005).....44
- Figura 6** – Liberação de casomorfina a partir da  $\beta$ -caseína A1 do leite de vaca.  $\beta$ -caseína A1 e A2 são variantes genéticas da proteína  $\beta$ -caseína do leite de vaca e se diferem por um aminoácido (A2 = Pro, A1 = His).....50

### Capítulo II:

- Figura 1** – Grau de hidrólise da caseína caprina utilizando as proteases produzidas pelos fungos *Penicillium decumbens* URM 6018, *Aspergillus viride-nutans* URM 6629, *Mucor guilliermondii* URM 5848, *Mucor subtilissimus* URM 4133 e *Mucor sp.* URM 4146, no planejamento fatorial  $2^3$ .....86
- Figura 2** – Gráficos de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis no GH da caseína caprina hidrolisada pelas proteases produzidas pelos fungos *Penicillium decumbens* URM 6018 (A), *Aspergillus viride-nutans* URM 6629 (B), *Mucor guilliermondii* URM 5848 (C), *Mucor subtilissimus* URM 4133 (D) e *Mucor sp.* URM 4146 (E) de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ .....87
- Figura 3** – Gel de Tricina-SDS-PAGE 15,4% da caseína caprina, hidrolisada em função do tempo e da temperatura, ao pH 6,5, por protease do *Penicillium decumbens* URM 6018. Onde, PM (Padrão Molecular), CCNH (Caseína Caprina Não Hidrolisada), sendo os números 1-12 correspondentes aos ensaios do planejamento fatorial  $2^3$ .....88
- Figura 4** – Gel de Tricina-SDS-PAGE 15,4% da caseína caprina, hidrolisada em função do tempo e da temperatura, ao pH 6,5, por protease do *Aspergillus viride-nutans* URM 6629. Onde, PM (Padrão Molecular), CCNH (Caseína Caprina Não Hidrolisada), sendo os números 1-12 correspondentes aos ensaios do planejamento fatorial  $2^3$ .....88

**Figura 5** – Gel de Tricina-SDS-PAGE 15,4% da caseína caprina, hidrolisada em função do tempo e da temperatura, ao pH 6,5, por protease do *Mucor guilliermondii* URM 5848. Onde, PM (Padrão Molecular), CCNH (Caseína Caprina Não Hidrolisada), sendo os números 1-12 correspondentes aos ensaios do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.....89

**Figura 6** – Gel de Tricina-SDS-PAGE 15,4% da caseína caprina, hidrolisada em função do tempo e da temperatura, ao pH 6,5, por protease do *Mucor subtilissimus* URM 4133. Onde, PM (Padrão Molecular), CCNH (Caseína Caprina Não Hidrolisada), sendo os números 1-12 correspondentes aos ensaios do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.....89

**Figura 7** – Gel de Tricina-SDS-PAGE 15,4% da caseína caprina, hidrolisada em função do tempo e da temperatura, ao pH 6,5, por protease do *Mucor sp.* URM 4146. Onde, PM (Padrão Molecular), CCNH (Caseína Caprina Não Hidrolisada), sendo os números 1-12 correspondentes aos ensaios do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>..... 90

### **Capítulo III:**

**Figura 1** – Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis independentes (Temperatura; Farelo de Trigo - F.T.; Farelo de Soja - F.S. e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) na produção de protease pelo fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133 de acordo com o planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup>..... 121

**Figura 2** – Determinação da massa molecular do extrato bruto e das frações purificadas por SDS-PAGE (10%) e zimograma, das proteínas do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133. (A). SDS-PAGE: Coluna 1, marcador molecular de proteína; Coluna 2, extrato bruto. (B). SDS-PAGE: Coluna 1, marcador molecular de proteína; Colunas 2 – 7, frações coletadas no FPLC utilizando coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) de exclusão molecular, com alto grau de pureza nas Colunas 6 e 7. (C). Zimograma (10%) da protease purificada em FPLC. .... 122

**Figura 3** – (A). pH ótimo da protease purificada produzida por fermentação submersa pelo *Mucor subtilissimus* URM 4133, nos tampões citrato – fosfato (◆), Tris – HCl (■) e carbonato – bicarbonato (▲). (B). Estabilidade ao pH da protease purificada, produzida por fermentação submersa pelo *Mucor subtilissimus* URM 4133, nos tampões citrato – fosfato (◆), Tris – HCl (■) e carbonato – bicarbonato (▲), após 24 horas de incubação. .... 123

**Figura 4** – (A). Temperatura ótima da protease purificada, produzida por fermentação submersa pelo *Mucor subtilissimus* URM 4133. (B). Estabilidade térmica da protease purificada, produzida por fermentação submersa pelo *Mucor subtilissimus* URM 4133, durante 1 hora (◆); 2 horas (■); 8 horas (▲) e 24 horas (×) ..... 123

<b>Figura 5</b> – Gráfico do duplo recíproco (Lineweaver-Burk) da taxa inicial de hidrólise de azocaseína pela protease do fungo <i>Mucor subtilissimus</i> URM 4133 versus a concentração de azocaseína. As barras de erro representam o desvio padrão.....	124
<b>Figura 6</b> – Gráfico de Arrhenius para a determinação da energia de ativação ( $E_a$ ) da serina protease purificada produzida pelo fungo <i>Mucor subtilissimus</i> URM 4133.....	124
<b>Figura 7</b> – Gráfico de primeira-ordem da desnaturação térmica irreversível da serina protease purificada do <i>Mucor subtilissimus</i> URM 4133.....	125
<b>Figura 8</b> – Gráfico de Arrhenius para calcular a energia de ativação ( $E_d$ ) da inativação/desnaturação térmica irreversível da serina protease purificada do fungo <i>Mucor subtilissimus</i> URM 4133.....	125
<b>Figura 9</b> – (A). Análise do espectro de massa MALDI-TOF da serina protease purificada produzida pelo <i>Mucor subtilissimus</i> URM 4133. O PMF da massa observada foi realizado utilizando o sistema de busca MASCOT.....	126
<b>Figura 9</b> – (B). Algumas proteínas correspondentes do banco de dado UniProt com a massa observada da serina protease purificada de <i>Mucor subtilissimos</i> URM 4133. ....	126
<b>Capítulo IV:</b>	
<b>Figura 1</b> – Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis independentes (Temperatura; Farelo de Trigo - F.T.; Farelo de Soja - F.S. e $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) na produção de protease pelo fungo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848 de acordo com o planejamento fatorial completo $2^4$ .....	158
<b>Figura 2</b> – Determinação da massa molecular do extrato bruto e das frações purificadas por SDS-PAGE (10%) e zimograma, das proteínas do fungo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848. (A). SDS-PAGE: Coluna 1, marcador molecular de proteína; Coluna 2, extrato bruto. (B). SDS-PAGE: Coluna 1, marcador molecular de proteína; Colunas 2 – 5, frações coletadas no FPLC utilizando coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) de exclusão molecular, com alto grau de pureza na Coluna 5. (C). Zimograma (10%) da protease purificada em FPLC. ....	159
<b>Figura 3</b> – (A). pH ótimo da protease purificada produzida por fermentação submersa pelo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848, nos tampões citrato – fosfato (◆), Tris – HCl (■) e carbonato – bicarbonato (▲). (B). Estabilidade ao pH da protease purificada, produzida por fermentação submersa pelo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848, nos	

tampões citrato – fosfato (◆), Tris – HCl (■) e carbonato – bicarbonato (▲), após 24 horas de incubação. .... 160

**Figura 4** – (A). Temperatura ótima da protease purificada, produzida por fermentação submersa pelo *Mucor guilliermondii* URM 5848. (B). Estabilidade térmica da protease purificada, produzida por fermentação submersa pelo *Mucor guilliermondii* URM 5848, durante 1 hora (◆); 2 horas (■); 8 horas (▲) e 24 horas (×). .... 160

**Figura 5** – Gráfico do duplo recíproco (Lineweaver-Burk) da taxa inicial de hidrólise de azocaseína pela protease do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848 versus a concentração de azocaseína. As barras de erro representam o desvio padrão..... 161

**Figura 6** – Gráfico de Arrhenius para a determinação da energia de ativação ( $E_a$ ) da serina protease purificada produzida pelo fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848. ....161

**Figura 7** – Gráfico de primeira-ordem da desnaturação térmica irreversível da serina protease purificada do *Mucor guilliermondii* URM 5848. .... 162

**Figura 8** – Gráfico de Arrhenius para calcular a energia de ativação ( $E_d$ ) da inativação/desnaturação térmica irreversível da serina protease purificada do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848. .... 162

**Figura 9** – (A). Análise do espectro de massa MALDI-TOF da serina protease purificada produzida pelo *Mucor guilliermondii* URM 5848. O PMF da massa observada foi realizado utilizando o sistema de busca MASCOT..... 163

**Figura 9** – (B). Algumas proteínas correspondentes do banco de dado UniProt com a massa observada da serina protease purificada de *Mucor guilliermondii* URM 5848. .... 163

## **Capítulo V:**

**Figura 1** – (A). Grau de hidrólise da caseína caprina no planejamento fatorial  $2^3$ . (B). Grau de hidrólise da caseína caprina a partir do ensaio 7 em função do tempo. As barras de erro representam o desvio padrão. .... 195

**Figura 2** – Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis no GH da caseína caprina hidrolisada pela protease purificada do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133 de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ . .... 195

**Figura 3** – (A). Gel de Tricina-SDS-PAGE do planejamento fatorial  $2^3$  da caseína caprina hidrolisada, sendo os números 1-12 correspondentes aos seus respectivos ensaios, M.M.: Marcador Molecular e NHC: Caseína não hidrolisada. (B). Gel de

Tricina-SDS-PAGE do ensaio 7 da hidrólise da caseína caprina em função do tempo, sendo os números 1-6 referentes aos tempos, 1h, 3h, 5h, 8h, 12h e 24h. ....	196
<b>Figura 4</b> – (A). Atividade antioxidante (%) do ABTS e DPPH dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (B). Atividade antioxidante Equivalente ( $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) do ABTS e DPPH dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (C). Atividade antioxidante (%) do ABTS e DPPH das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas. (D). Atividade antioxidante Equivalente ( $\mu\text{M}.\text{mL}^{-1}$ ) do ABTS e DPPH das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas. ....	197
<b>Figura 5</b> – (A). Atividade de ORAC-FL dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (B). Atividade de ORAC-FL das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas. As barras de erro representam o desvio padrão. ....	198
<b>Figura 6</b> – (A). Atividade anti-hipertensiva (%) dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (B). Atividade anti-hipertensiva das frações (< 3 kDa) de peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas. As barras de erro representam o desvio padrão. ....	199
<b>Figura 7</b> – (A). Cromatograma de exclusão molecular das frações (< 3 kDa) dos peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise da caseína caprina. (B). Cromatografia de exclusão molecular das frações (< 3 kDa) dos peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise ao final da digestão intestinal de 120 minutos. ....	199

## Capítulo VI:

<b>Figura 1</b> – (A). Grau de hidrólise da caseína caprina no planejamento fatorial $2^3$ . (B). Grau de hidrólise da caseína caprina a partir do ensaio 7 em função do tempo. As barras de erro representam o desvio padrão. ....	234
<b>Figura 2</b> – Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis no GH da caseína caprina hidrolisada pela protease purificada do fungo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848 de acordo com o planejamento fatorial $2^3$ . ....	235
<b>Figura 3</b> – (A). Gel de Tricina-SDS-PAGE do planejamento fatorial $2^3$ da caseína caprina hidrolisada, sendo os números 1-12 correspondentes aos seus respectivos ensaios, M.M.: Marcador Molecular e NHC: Caseína não hidrolisada. (B). Gel de Tricina-SDS-PAGE do ensaio 7 da hidrólise da caseína caprina em função do tempo, sendo os números 1-6 referentes aos tempos, 1h, 3h, 5h, 8h, 12h e 24h. ....	236

<b>Figura 4</b> – (A). Atividade antioxidante (%) do ABTS e DPPH dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (B). Atividade antioxidante Equivalente ( $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do ABTS e DPPH dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (C). Atividade antioxidante (%) do ABTS e DPPH das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas. (D). Atividade antioxidante Equivalente ( $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do ABTS e DPPH das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas. ....	237
<b>Figura 5</b> – (A). Atividade de ORAC-FL dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (B). Atividade de ORAC-FL das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas. As barras de erro representam o desvio padrão. ....	238
<b>Figura 6</b> – (A). Atividade anti-hipertensiva (%) dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (B). Atividade anti-hipertensiva das frações (< 3 kDa) de peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas. As barras de erro representam o desvio padrão. ....	239
<b>Figura 7</b> – (A) Cromatograma de exclusão molecular das frações (< 3 kDa) dos peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise da caseína caprina. (B). Cromatografia de exclusão molecular das frações (< 3 kDa) dos peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise ao final da digestão intestinal de 120 minutos. ....	239

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I:

**Tabela 1** – Peptídeos bioativos derivados de proteínas do leite. Fonte: Meisel; Bockelmann, 1999.....59

### Capítulo II:

**Tabela 1** – Matriz do planejamento fatorial  $2^3$  para analisar os fatores de influência no grau de hidrólise (GH) da caseína caprina por proteases de diferentes fungos filamentosos URM. ....80

**Tabela 2** – Atividade proteolítica total ( $\text{U.mL}^{-1}$ ) e atividade específica ( $\text{U.mg}^{-1}$ ) de proteases produzidas por fungos filamentosos URM. ....80

**Tabela 3** – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo *Penicillium decumbens* URM 6018 de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ . ....81

**Tabela 4** – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo *Aspergillus viride-nutans* URM 6629 de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ . ....81

**Tabela 5** – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848 de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ . ....82

**Tabela 6** – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133 de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ . ....82

**Tabela 7** – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo *Mucor* sp. URM 4146 de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ . ....83

**Tabela 8** – Atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, das frações entre 3 kDa – 10 kDa e < 3 kDa de peptídeos. Concentração de  $4 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Os símbolos (+) e (-) indicam a presença ou ausência de inibição do crescimento microbiano, respectivamente. ....84

**Tabela 9** – Atividade sequestradora dos radicais ABTS e DPPH em (%), das frações de peptídeos com massas moleculares entre 3 kDa-10 kDa e < 3 kDa, hidrolisadas a partir de caseína caprina (Relação E/S = -1, Temperatura = +1 e Tempo = +1) . Concentração de  $4 \text{ mg.mL}^{-1}$ . ....84

**Tabela 10** – Atividade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) em %, a partir de hidrolisados da caseína caprina (Relação E/S = -1, Temperatura = +1 e Tempo = +1). Concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>.....85

### **Capítulo III:**

**Tabela 1** – Matriz do planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> para analisar os fatores de influência na produção de protease pelos fungos *Mucor subtilissimus* URM 4133. ....117

**Tabela 2** – Matriz do planejamento fatorial fracionado 2<sup>4</sup>, contendo quatro pontos centrais associados com a variável resposta atividade proteásica total do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133. .... 117

**Tabela 3** – Análise de variância (ANOVA), para verificar a influências dos parâmetros utilizados no planejamento fatorial fracionado 2<sup>4</sup> sob a produção de protease pelo fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133. .... 118

**Tabela 4** – Etapas de purificação para a protease do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133. .... 118

**Tabela 5** – Efeito de íons metálicos, surfactantes e inibidores na atividade da protease purificada produzida pelo fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133. .... 119

**Tabela 6** – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da serina protease produzida pelo fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133 em fermentação submersa utilizando farelo de soja e farelo de trigo como substratos..... 120

**Tabela 7** – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos de desnaturação térmica irreversível da serina protease purificada do *Mucor subtilissimus* URM 4133..... 120

### **Capítulo IV:**

**Tabela 1** – Matriz do planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> para analisar os fatores de influência na produção de protease pelos fungos *Mucor guilliermondii* URM 5848. ....154

**Tabela 2** – Matriz do planejamento fatorial fracionado 2<sup>4</sup>, contendo quatro pontos centrais associados com a variável resposta atividade proteásica total do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848. .... 154

**Tabela 3** – Análise de variância (ANOVA), para verificar a influência dos parâmetros utilizados no planejamento fatorial fracionado 2<sup>4</sup> sob a produção de protease pelo fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848. .... 155

**Tabela 4** – Etapas de purificação para a protease do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848. .... 155

<b>Tabela 5</b> – Efeito de íons metálicos, surfactantes e inibidores na atividade da protease purificada produzida pelo fungo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848.....	156
<b>Tabela 6</b> – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da serina protease produzida pelo fungo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848 em fermentação submersa utilizando farelo de soja e farelo de trigo como substratos.....	157
<b>Tabela 7</b> – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos de desnaturação térmica irreversível da serina protease purificada do <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848.....	157
<b>Capítulo V:</b>	
<b>Tabela 1</b> – Matriz do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para analisar os fatores de influência no grau de hidrólise (GH) da caseína caprina por protease purificada do fungo <i>Mucor subtilissimus</i> URM 4133.....	189
<b>Tabela 2</b> – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo <i>Mucor subtilissimus</i> URM 4133 de acordo com o planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> . .....	189
<b>Tabela 3</b> – Atividade antimicrobiana em %, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina, em função do tempo. Concentração de 500 µg.mL <sup>-1</sup> . .....	190
<b>Tabela 4</b> – Atividade antimicrobiana em %, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise. Concentração de 500 µg.mL <sup>-1</sup> .....	190
<b>Tabela 5</b> – Atividade quelante de Cu <sup>2+</sup> e Fe <sup>2+</sup> em %, dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina e das frações (< 3 kDa) de peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise. Concentração de 250 µg.mL <sup>-1</sup> .....	191
<b>Tabela 6</b> – IC <sub>50</sub> da atividade anti-hipertensiva das frações (< 3 kDa) de peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise. ....	191
<b>Tabela 7</b> – Atividades biológicas residuais do <i>pool</i> de hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina, provenientes do ensaio de 12 horas, após o ensaio de digestão gastrointestinal. ....	192
<b>Tabela 8</b> – Peptídeos identificados por espectrometria de massa (MS/MS) das frações (< 3 kDa) provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise da caseína caprina....	193
<b>Capítulo VI:</b>	
<b>Tabela 1</b> – Matriz do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para analisar os fatores de influencia no grau de hidrólise (GH) da caseína caprina por protease purificada do fungo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848. ....	228

<b>Tabela 2</b> – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848 de acordo com o planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> . .....	228
<b>Tabela 3</b> – Atividade antimicrobiana em %, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina, em função do tempo. Concentração de 500 µg.mL <sup>-1</sup> . .....	229
<b>Tabela 4</b> – Atividade antimicrobiana em %, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise. Concentração de 500 µg.mL <sup>-1</sup> . .....	229
<b>Tabela 5</b> – Atividade quelante de Cu <sup>2+</sup> e Fe <sup>2+</sup> em %, dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina e das frações (< 3 kDa) de peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise. Concentração de 250 µg.mL <sup>-1</sup> . .....	230
<b>Tabela 6</b> – IC <sub>50</sub> da atividade anti-hipertensiva das frações (< 3 kDa) de peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise. ....	230
<b>Tabela 7</b> – Atividades biológicas residuais do <i>pool</i> de hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina, provenientes do ensaio de 12 horas, após o ensaio de digestão gastrointestinal. ....	231
<b>Tabela 8</b> – Peptídeos identificados por espectrometria de massa (MS/MS) das frações (< 3 kDa) provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise da caseína caprina. ....	232

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>AAPH</b>	2,2-azobis(2-metilpropianomidina) dihidroclorido
<b>ABTS</b>	2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
<b>ACN</b>	Acetonitrila
<b>BDA</b>	Batata dextrose ágar
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>CMH</b>	Caldo Mueller Hinton
<b>Da</b>	Dálon
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
<b>ECA</b>	Enzima conversora de angiotensina
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetracético
<b>FAPGG</b>	N-[3-(2-Furil)acriloil-Phe-Gly-Gly
<b>GH</b>	Grau de hidrólise
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>J</b>	Joule
<b>kDa</b>	Quilodálon
<b>kJ</b>	Quilojoule
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mU</b>	Miliunidade
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida
<b>PMSF</b>	Fluoreto de fenilmetanosulfonil
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>TNBS</b>	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico

<b>Tris</b>	2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
<b>TSB</b>	Caldo triptona de soja
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I:</b> .....	30
Introdução Geral e Revisão da Literatura.....	30
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	31
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	33
2.1. <b>Objetivo Geral</b> .....	33
2.2. <b>Objetivos Específicos</b> .....	33
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	33
3.1. <b>Caseína</b> .....	33
3.2. <b>Proteases</b> .....	35
3.3. <b>Mecanismos de ação das proteases</b> .....	37
3.4. <b>Peptídeos biologicamente ativos</b> .....	40
3.4.1. Peptídeos antimicrobianos.....	41
3.4.2. Peptídeos antioxidantes.....	45
3.4.3. Peptídeos anti-hipertensivos.....	47
3.5. <b>Peptídeos derivados da caseína também podem apresentar efeitos nocivos</b> .....	48
<b>4. REFERÊNCIAS</b> .....	50
<b>CAPÍTULO II:</b> .....	61
Avaliação das atividades biológicas de peptídeos liberados pela hidrólise da caseína caprina por proteases fúngicas.....	61
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	63
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	64
2.1. <b>Micro-organismos</b> .....	64
2.2. <b>Produção de proteases</b> .....	64
2.3. <b>Atividade proteolítica e proteína total</b> .....	65
2.4. <b>Preparação da caseína caprina</b> .....	65
2.5. <b>Hidrólise da caseína caprina</b> .....	66
2.6. <b>Determinação do grau de hidrólise (GH)</b> .....	67
2.7. <b>Eletroforese Tricina-SDS-PAGE dos hidrolisados</b> .....	68
2.8. <b>Avaliação das atividades biológicas dos hidrolisados</b> .....	68
2.8.1. Atividade antimicrobiana.....	68
2.8.2. Atividade antioxidante.....	69
2.8.3. Atividade anti-hipertensiva.....	70

2.9.	<b>Análise estatística</b> .....	70
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	71
3.1.	<b>Produção de proteases</b> .....	71
3.2.	<b>Grau de hidrólise (GH)</b> .....	71
3.3.	<b>Eletroforese Tricina-SDS-PAGE dos hidrolisados</b> .....	73
3.4.	<b>Avaliação das atividades biológicas dos hidrolisados</b> .....	74
3.4.1.	Atividade antimicrobiana.....	74
3.4.2.	Atividade antioxidante.....	75
3.4.3.	Atividade anti-hipertensiva.....	76
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	76
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	76
<b>CAPÍTULO III:</b> .....		91
Purificação, caracterização bioquímica, parâmetros cinéticos e termodinâmicos de uma nova serina protease de <i>Mucor subtilissimus</i> URM 4133.....		91
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	93
<b>2.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	94
2.1.	<b>Micro-organismo</b> .....	94
2.2.	<b>Produção de protease</b> .....	94
2.3.	<b>Atividade proteolítica e proteína total</b> .....	95
2.4.	<b>Eletroforese SDS-PAGE e Zimograma</b> .....	95
2.5.	<b>Purificação da protease</b> .....	96
2.6.	<b>Caracterização bioquímica da protease purificada</b> .....	97
2.6.1.	Temperatura e pH ótimos.....	97
2.6.2.	Estabilidade a temperatura e ao pH.....	97
2.6.3.	Efeitos de íons metálicos, compostos orgânicos e inibidores na atividade proteásica.....	97
2.7.	<b>Determinação dos parâmetros cinéticos <math>K_m</math> e <math>V_{max}</math></b> .....	98
2.8.	<b>Energia de ativação e coeficiente de temperatura (<math>Q_{10}</math>)</b> .....	98
2.9.	<b>Termodinâmica da reação enzimática</b> .....	99
2.10.	<b>Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de inativação térmica</b> .....	100
2.11.	<b>Prospecção peptídica por espectrometria de massa (MALDI-TOF)</b> .....	101
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	101
3.1.	<b>Produção de protease</b> .....	101

<b>3.2. Purificação da protease.....</b>	<b>103</b>
<b>3.3. Caracterização bioquímica da protease purificada.....</b>	<b>103</b>
3.3.1. Efeito do pH na atividade enzimática e estabilidade.....	103
3.3.2. Efeito da temperatura na atividade enzimática e estabilidade.....	104
3.3.3. Efeitos de íons metálicos, compostos orgânicos e inibidores.....	105
<b>3.4. Parâmetros cinéticos <math>K_m</math> e <math>V_{max}</math>.....</b>	<b>106</b>
<b>3.5. Energia de ativação e coeficiente de temperatura (<math>Q_{10}</math>).....</b>	<b>106</b>
<b>3.6. Termodinâmica da reação enzimática.....</b>	<b>107</b>
<b>3.7. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos de inativação térmica.....</b>	<b>108</b>
<b>3.8. Prospecção peptídica por espectrometria de massa (MALDI-TOF).....</b>	<b>110</b>
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>111</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>112</b>
<b>CAPÍTULO IV:.....</b>	<b>127</b>
Uma nova serina protease de <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848: Purificação, caracterização bioquímica, parâmetros cinéticos e termodinâmicos.....	127
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>129</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>130</b>
2.1. Micro-organismo.....	130
2.2. Produção de protease.....	131
2.3. Atividade proteolítica e proteína total.....	131
2.4. Eletroforese SDS-PAGE e Zimograma.....	131
2.5. Purificação da protease.....	132
<b>2.6. Caracterização bioquímica da protease purificada.....</b>	<b>133</b>
2.6.1. Temperatura e pH ótimos.....	133
2.6.2. Estabilidade a temperatura e ao pH.....	133
2.6.3. Efeitos de íons metálicos, compostos orgânicos e inibidores na atividade proteásica.....	134
<b>2.7. Determinação dos parâmetros cinéticos <math>K_m</math> e <math>V_{max}</math>.....</b>	<b>134</b>
<b>2.8. Energia de ativação e coeficiente de temperatura (<math>Q_{10}</math>).....</b>	<b>135</b>
<b>2.9. Termodinâmica da reação enzimática.....</b>	<b>135</b>
<b>2.10. Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de inativação térmica.....</b>	<b>136</b>
<b>2.11. Prospecção peptídica por espectrometria de massa (MALDI-TOF).....</b>	<b>137</b>
<b>3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>137</b>

<b>3.1. Produção de protease</b> .....	137
<b>3.2. Purificação da protease</b> .....	139
<b>3.3. Caracterização bioquímica da protease purificada</b> .....	139
3.3.1. Efeito do pH na atividade enzimática e estabilidade.....	139
3.3.2. Efeito da temperatura na atividade enzimática e estabilidade.....	140
3.3.3. Efeitos de íons metálicos, compostos orgânicos e inibidores.....	141
<b>3.4. Parâmetros cinéticos <math>K_m</math> e <math>V_{max}</math></b> .....	142
<b>3.5. Energia de ativação e coeficiente de temperatura (<math>Q_{10}</math>)</b> .....	143
<b>3.6. Termodinâmica da reação enzimática</b> .....	143
<b>3.7. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos de inativação térmica</b> .....	144
<b>3.8. Prospecção peptídica por espectrometria de massa (MALDI-TOF)</b> .....	147
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	147
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	148
<b>CAPÍTULO V:</b> .....	164
Prospecção de peptídeos multifuncionais por hidrólise da caseína caprina com protease do fungo <i>Mucor subtilissimus</i> URM 4133: Avaliação das atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-hipertensivas.....	164
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	166
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	167
<b>2.1. Obtenção da caseína caprina</b> .....	167
<b>2.2. Determinação da atividade proteolítica</b> .....	168
<b>2.3. Hidrólise da caseína caprina</b> .....	168
<b>2.4. Determinação do grau de hidrólise (GH)</b> .....	168
<b>2.5. Eletroforese Tricina-SDS-PAGE dos hidrolisados</b> .....	169
<b>2.6. Determinação da proteína total</b> .....	170
<b>2.7. Avaliação das atividades biológicas dos hidrolisados</b> .....	170
<b>2.8. Atividade antimicrobiana</b> .....	170
<b>2.9. Atividade antioxidante</b> .....	171
2.9.1. Atividade sequestradora de radicais ABTS <sup>•+</sup> e DPPH.....	171
2.9.2. Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC).....	172
2.9.3. Atividade quelante de íons metálicos.....	172
<b>2.10. Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA)</b> .....	173
<b>2.11. Avaliação do processo de digestão <i>in vitro</i> sob as atividades biológicas</b> .....	174

2.12. Cromatografia de exclusão molecular.....	174
2.13. Análise por espectrometria de massa.....	175
2.14. Análise estatística.....	175
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>176</b>
3.1. Grau de hidrólise (GH).....	176
3.2. Eletroforese Tricina-SDS-PAGE.....	176
3.3. Atividade antimicrobiana.....	177
3.4. Atividade antioxidante.....	178
3.4.1. Atividade sequestradora de radicais ABTS <sup>+</sup> e DPPH.....	178
3.4.2. Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC).....	179
3.4.3. Atividade quelante de íons metálicos.....	180
3.5. Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA).....	180
3.6. Avaliação do processo de digestão <i>in vitro</i> sob as atividades biológicas.....	181
3.7. Cromatografia de exclusão molecular.....	183
3.8. Espectrometria de massa.....	183
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>184</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>184</b>
<b>CAPÍTULO VI:.....</b>	<b>200</b>
Propriedades bioativas de peptídeos obtidos a partir da hidrólise da caseína caprina por uma serina protease produzida pelo fungo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848.....	200
1. <b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>202</b>
2. <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>204</b>
2.1. <b>Obtenção da caseína caprina.....</b>	<b>204</b>
2.2. <b>Determinação da atividade proteolítica.....</b>	<b>204</b>
2.3. <b>Hidrólise da caseína caprina.....</b>	<b>204</b>
2.4. <b>Determinação do grau de hidrólise (GH).....</b>	<b>205</b>
2.5. <b>Eletroforese Tricina-SDS-PAGE dos hidrolisados.....</b>	<b>206</b>
2.6. <b>Determinação da proteína total.....</b>	<b>206</b>
2.7. <b>Avaliação das atividades biológicas dos hidrolisados.....</b>	<b>206</b>
2.8. <b>Atividade antimicrobiana.....</b>	<b>207</b>
2.9. <b>Atividade antioxidante.....</b>	<b>207</b>
2.9.1. Atividade sequestradora de radicais ABTS <sup>+</sup> e DPPH.....	207
2.9.2. Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC).....	208

2.9.3. Atividade quelante de íons metálicos.....	209
<b>2.10. Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA).....</b>	<b>210</b>
<b>2.11. Avaliação do processo de digestão <i>in vitro</i> sob as atividades biológicas.....</b>	<b>210</b>
<b>2.12. Cromatografia de exclusão molecular.....</b>	<b>211</b>
<b>2.13. Análise por espectrometria de massa.....</b>	<b>211</b>
<b>2.14. Análise estatística.....</b>	<b>212</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>212</b>
<b>3.1. Grau de hidrólise (GH).....</b>	<b>212</b>
<b>3.2. Eletroforese Tricina-SDS-PAGE.....</b>	<b>213</b>
<b>3.3. Atividade antimicrobiana.....</b>	<b>214</b>
<b>3.4. Atividade antioxidante.....</b>	<b>215</b>
3.4.1. Atividade sequestradora de radicais ABTS <sup>+</sup> e DPPH.....	215
3.4.2. Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC).....	216
3.4.3. Atividade quelante de íons metálicos.....	217
<b>3.5. Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA).....</b>	<b>217</b>
<b>3.6. Avaliação do processo de digestão <i>in vitro</i> sob as atividades biológicas.....</b>	<b>218</b>
<b>3.7. Cromatografia de exclusão molecular.....</b>	<b>220</b>
<b>3.8. Espectrometria de massa.....</b>	<b>221</b>
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>222</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>222</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>240</b>

**CAPÍTULO I:**  
**Introdução Geral e Revisão da Literatura**

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a busca do consumidor por alimentos conhecidos como funcionais, ou seja, que promovam benefícios à saúde, além do atendimento nutricional básico, encontra-se em constante crescimento. Esta vertente de mercado encontra-se em processo de evolução e é utilizada como uma estratégia potencial na prevenção de doenças crônicas, pelos seus benefícios fisiológicos ou redução dos riscos dessas doenças, independentemente de suas propriedades nutricionais (STRATTON et al., 2015).

Diversas substâncias com propriedades bioativas vêm sendo descritas junto com a sua funcionalidade na fisiologia do organismo, entre elas estão os peptídeos biologicamente ativos, moléculas derivadas de proteínas complexas que podem desempenhar diversos benefícios para a homeostase do organismo (UDENIGWE; ALUKO, 2012).

Em termos nutricionais, a composição de aminoácidos e a presença de fatores que limitem a biodisponibilidade das proteínas, por exemplo, são características importantes para determinar a qualidade desta macromolécula. Os peptídeos bioativos, além de possuírem elevado valor nutritivo, são capazes de gerar efeitos fisiológicos no organismo (SAAVEDRA et al., 2013).

Os principais efeitos fisiológicos atribuídos a estas moléculas abrangem atividades do tipo imunomodulatória, anti-hipertensiva, antitrombótica, antimicrobiana, antioxidante e efeitos opióides (ARTEMOVA et al., 2010; DI BERNARDINI et al., 2011; ROJAS-RONQUILLO et al., 2012; CHALAMAIAH et al., 2014). Outras atividades como potencial anti-inflamatório e atividade anticâncer também são descritas como efeitos auxiliares na manutenção da saúde dos consumidores (VO; RYO; KIM, 2013; U MAYAPARVATHI et al., 2014). Diversos trabalhos já tratam dos estudos e benefícios associados aos peptídeos, como por exemplo, os gerados a partir de proteínas de leite e derivados (MADUREIRA et al., 2010; CHOI et al., 2012).

Dessa forma, os peptídeos bioativos apresentam atualmente, grande interesse industrial. Neste sentido, a caseína, é considerada como uma importante fonte de fornecimento destas moléculas, as quais podem ser liberadas através do processo de digestão gastrointestinal, durante o processamento de alimentos, ou através da via proteolítica de enzimas exógenas provenientes de micro-organismos ou fontes vegetais (BRUNO et al., 2010).

A caseína bovina é a principal matéria-prima que tem sido estudada no mundo todo com este objetivo e apresenta resultados bastante interessantes (CHOI et al., 2012). Entretanto, pouco foi divulgado com a utilização da caseína caprina para a mesma finalidade. Isto se torna interessante, tanto para preencher uma lacuna científica, quanto pela oportunidade sócio-econômica que se vislumbra para incentivar ainda mais esta atividade agropecuária no país.

A caprinocultura de leite representa um ramo com alto potencial de exploração e necessita de maiores incentivos, principalmente por se destacar como atividade de elevado impacto socioeconômico para produtores rurais no Brasil. Tradicionalmente, a criação de caprinos é característica das regiões Nordeste, que detém 92% do rebanho caprino nacional, e Sudeste do país. Entretanto, vem se tornando representativa também no Rio Grande do Sul, onde a raça Saanen corresponde a uma das principais raças leiteiras presentes nestas regiões (GONÇALVES et al., 2001; SCHMIDT et al., 2009; AQUINO et al., 2016).

De forma geral, as principais proteínas presentes no leite caprino, também são as encontradas no leite bovino, tanto com relação às frações da caseína ( $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -), quanto às proteínas presentes no soro como a  $\beta$ -lactoglobulina e a  $\beta$ -lactoalbumina. Entretanto, ocorrem várias diferenças na composição e no conteúdo destas proteínas entre as raças caprinas, devido ao alto polimorfismo encontrado em quatro genes responsáveis pela síntese da molécula de caseína, com vários alelos (fortes, fracos e nulos) envolvidos neste processo (BALLABIO et al., 2011). Conseqüentemente, a mudança de alguns aminoácidos na sequência proteica faz com que se tenham mudanças nas atividades biológicas dos peptídeos. Este trabalho foi desenvolvido para alcançar os objetivos descrito a seguir.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar as atividades biológicas de peptídeos provenientes da caseína caprina, liberados através da hidrólise de proteases sintetizadas por fungos filamentosos.

### 2.2. Objetivos específicos

- 1) Selecionar os melhores produtores de proteases com potencial para liberação de peptídeos bioativos, entre cinco espécies de fungos filamentosos;
- 2) Estudar a produção, a purificação e a caracterização das proteases provenientes dos fungos selecionados.
- 3) Avaliar *in vitro* as atividades biológicas dos hidrolisados, como a atividade antimicrobiana, antioxidante e atividade anti-hipertensiva;
- 4) Identificar a sequência de peptídeos bioativos menores que 3 kDa presentes em frações separadas em sistema FPLC.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

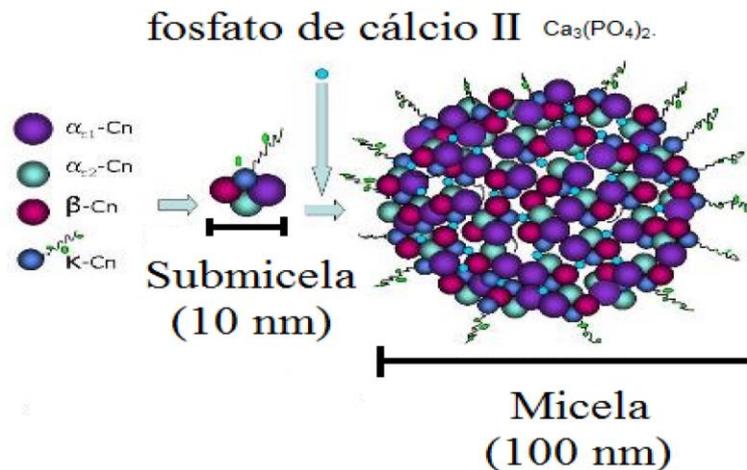
### 3.1. Caseína

As caseínas, partículas de dimensões coloidais, representam as proteínas predominantes no leite, aproximadamente 80% do conteúdo proteico, constituindo-se de um grupo heterogêneo de fosfoproteínas que estabilizam o fosfato de cálcio em estruturas micelares (Figura 1). São compostas por quatro frações principais ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseína). Estas micelas apresentam nano partículas de fosfato de cálcio, ligadas aos grupos fosfoserina das frações  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - e  $\beta$ -caseína e estão em equilíbrio com as concentrações de cálcio e fosfato presentes na fase solúvel. Além disso, a  $\kappa$ -caseína é responsável por formar uma camada na superfície das micelas para auxiliar no processo de estabilização (NAIR et al., 2014).

As micelas de caseína são responsáveis por funções biológicas que incluem o transporte e fornecimento, principalmente de fosfato de cálcio e proteínas, assim como, o provimento de aminoácidos essenciais e a formação de substâncias bioativas (YAZDI; CORREDIG, 2012). Apresentam raio médio de cerca de 100 nm e o seu tamanho é limitado diretamente pela  $\kappa$ -caseína, que contribui para a repulsão eletrostática entre as micelas e impede que elas formem agregados. Este processo ocorre devido à formação de um diferencial eletrostático na superfície da micela, causado pela  $\kappa$ -caseína. A variação na carga líquida das micelas diminui com a

redução do pH do meio até seu ponto isoelétrico (pH 4,6), o que faz com que ocorra a formação de agregados (GONZALEZ-JORDAN et al., 2015).

**Figura 1** – Frações, submicela e micela de caseína.



Fonte: Faria, 2011.

O caseinato de sódio é obtido após precipitação da caseína no seu ponto isoelétrico e, como consequência, se têm a remoção do fosfato de cálcio. Em seguida, a caseína é novamente solubilizada por meio da adição de hidróxido de sódio (NaOH) até pH próximo à neutralidade. Isto faz com que haja a formação de submicelas com raio de 10 nm devido a força iônica e consequentemente têm-se o aumento da turbidez (THOMAR; NICOLAI, 2015).

As frações  $\alpha_{s1}$ - e  $\alpha_{s2}$ -, correspondem a 40% e 10%, respectivamente, de toda a caseína presente no leite. Estas frações são fosfoproteínas que apresentam grau variável de fosforilação e alta proporção de resíduos de prolina, que estão distribuídos ao longo da molécula. Devido a este fator, estas duas frações proteicas não apresentam um estrutura terciária bem definida e são constituídas predominantemente de estruturas secundárias significativas ( $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -folhas). Portanto, sua estrutura se torna mais flexível e aberta, consequentemente, mais sensíveis às proteases e peptidases (LISSON; LOCHNIT; ERHARDT, 2014).

As frações proteicas da caseína apresentam domínios hidrofóbicos e hidrofílicos distintos. Por exemplo, a fração  $\alpha_{s1}$ -, apresenta um peptídeo, altamente ácido, composto por 40 aminoácidos e que contém sete dos oito grupos de fosfato presentes nesta fração, além de 12 grupos carboxílicos. A região N-terminal altamente carregada da fração  $\beta$ - contém quatro dos cinco grupos fosfatos existentes na

molécula e sete grupos carboxílicos. Já a  $\kappa$ -caseína, apresenta apenas um grupo fosfato e 14 grupos de ácidos carboxílicos localizados na região C-terminal hidrofílica de um glicomacropéptido. Essas interações entre grupos fosfatos e carboxílicos conferem o grau de hidrofobicidade das frações de caseína (ELZOGHBY; EL-FOTOH; ELGINDY, 2011).

A principal diferença entre a caseína de origem bovina e a de origem caprina, está relacionada ao polimorfismo genético associado principalmente ao gene CSN1S1 que codifica a fração  $\alpha_{s1}$ - da caseína caprina. Consequentemente são geradas influências no processo de coagulação do leite, bem como na redução de alergias associadas ao consumo de leite caprino (BALLABIO et al., 2011; PAZZOLA et al., 2014). Dan et al. (2016) relatam também que o gene CSN2 exerce influência na regulação da expressão das proteínas presentes no leite caprino.

A caseína proveniente do leite de cabra possui alta variabilidade qualitativa, como consequência da diferença que existe no processo de expressão da proteína. Essa variabilidade é causada pelo polimorfismo estrutural dos genes relacionados à síntese da caseína, que também apresenta modificações pós traducionais (MONTALBANO et al., 2016). Neste sentido, a baixa concentração da fração  $\alpha_{s1}$ - da caseína caprina, em comparação à fração similar da caseína bovina corresponde ao principal fator para a substituição do leite de vaca pelo leite de cabra em lactentes e pacientes alérgicos (HAM et al., 2010).

As semelhanças e diferenças no perfil de aminoácidos tanto entre as caseínas caprina e bovina, quanto dentro das frações de caseína caprina, podem ser encontradas a partir de diversos estudos, através do UniProt (Universal Protein Resource [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)).

### **3.2. Proteases**

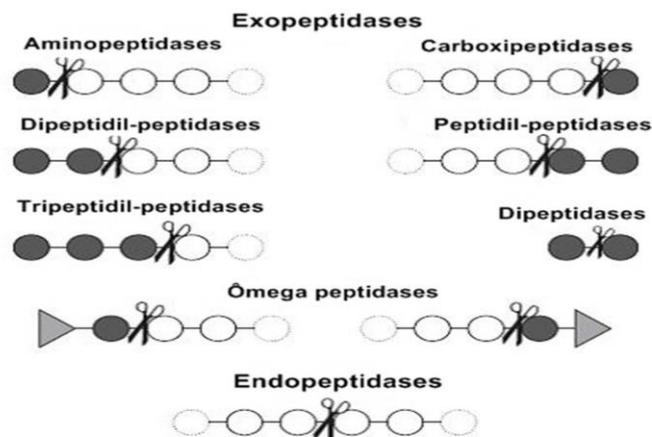
Proteases, ou peptidases, são enzimas responsáveis por degradar as proteínas em pequenos segmentos, por meio de clivagem das ligações peptídicas. Estas enzimas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e são consideradas moléculas críticas para o funcionamento normal de todas as células e organismos, o que inclui mecanismos de diferenciação celular, apoptose, mecanismos reguladores, processos de cicatrização, senescência, necrose e resposta imune (BARRETT; RAWLINGS, 2007; DADSHAHI et al., 2016; HOMAEI; LAVAJOO; SARIRI, 2016).

As proteases pertencem ao grupo de enzimas denominadas de hidrolases, ou seja, para que as reações ocorram e o produto seja liberado se faz necessário no meio de reação à presença da água. Durante a realização de hidrólise das ligações peptídicas, ocorre à transferência do produto formado para a água. Esse processo proteolítico resulta em mudança específica da função da proteína, o que representa um importante mecanismo biológico (LÓPEZ-OTIN; OVERALL, 2002).

Estas enzimas podem ser classificadas de acordo com a sua especificidade de ligação no processo de catálise (Figura 2). Aquelas que atuam nas extremidades das cadeias polipeptídicas são denominadas de exopeptidases, em comparação às endopeptidases, as quais apresentam atividade catalítica em regiões mais internas. Da interação e atuação das exopeptidases sob os grupos amino-terminal e carboxi-terminal, pode-se obter a liberação de um único aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo. Os aminoácidos próximos às ligações peptídicas cliváveis, em ambos os lados, representam o principal fator determinante para a atuação das endopeptidases (TAVANO, 2013).

Além disso, as proteases são agrupadas com base no mecanismo catalítico de seu sítio ativo em classes distintas, de acordo com a especificidade da enzima aos resíduos de aminoácidos ou íons metálicos presentes. Dessa forma, pode-se considerar como principais as serina proteases, treonina proteases, cisteína proteases, aspártico proteases, glutâmico proteases e metaloproteases. Em geral, as proteases também podem ser classificadas apenas pelo seu pH ótimo, em ácidas, neutras ou alcalinas (CASTRO et al., 2011).

**Figura 2** – Classificação de proteases de acordo com sua região de catálise.



Fonte: Moffitt et al. (2010).

Estas singularidades, entre os diversos tipos de enzimas proteolíticas, tornam viáveis as possibilidades de ativação ou inativação enzimática por pequenas moléculas específicas, que são de grande importância na pesquisa científica, assim como diversos compostos biológicos especializados, essenciais para a manutenção e equilíbrio de ação das proteases em todos os organismos vivos (YIKE, 2011).

Devido ao seu vasto potencial biotecnológico, as proteases representam 60% do total de enzimas produzidas pela indústria e são utilizadas extensivamente em diversos segmentos industriais, como no alimentício, detergentes, couro e farmacêutico. Vale considerar que, estas enzimas podem ser obtidas de três fontes distintas: microbiana; vegetal e animal (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; UYAR et al., 2011; DADSHAHI et al., 2016).

As proteases são utilizadas de formas diferentes dependendo do seu tipo de aplicação, ou seja, as proteases utilizadas na indústria farmacêutica, diferem das aplicadas nas indústrias de alimento e de detergente. Na indústria farmacêutica, por exemplo, as proteases são produzidas em quantidades reduzidas e passam por processos de purificação até atingirem altos graus de pureza, antes de serem introduzidas no mercado. Já para a grande maioria das outras indústrias estas enzimas são produzidas em elevadas quantidades, e utilizadas até mesmo na forma de extrato bruto (HOMAEI; LAVAJOO; SARIRI, 2016)

Os micro-organismos se apresentam como uma excelente fonte de proteases, por sua ampla diversidade bioquímica e sua susceptibilidade à manipulação genética. A produção enzimática é diretamente influenciada pelos componentes do meio (fontes de carbono e nitrogênio), metais, pH, temperatura, oxigênio dissolvido e tempo de incubação (HADDAR et al., 2010). Além disso, proteases de origem microbiana são consideradas excelentes substitutas, por exemplo, no processo de coagulação do leite e hidrólise das caseínas. Isso se deve a sua disponibilidade, estabilidade e capacidade de produção a partir de substratos baratos para a fermentação, o que as torna moléculas de baixo custo (MERHEB-DINI et al., 2010).

### **3.3. Mecanismo de ação das proteases**

O mecanismo de catálise nas serina, treonina e cisteína proteases, utiliza como nucleófilo responsável pelo ataque das ligações peptídicas dos seus substratos específicos, o resíduo de aminoácido dominante presente no sítio ativo de onde são derivadas as suas nomenclaturas. Já no caso das metalo, aspártico e glutâmico

proteases, estas utilizam como nucleófilo, uma molécula ativada de água (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008).

As serina proteases correspondem à maior família de proteases existentes e estão envolvidas em diversos processos fisiológicos. Seu sítio ativo apresenta como nucleófilo a serina, além de resíduos de histidina e ácido aspártico que completam a tríade catalítica. Entretanto, em algumas serina proteases o nucleófilo é combinado apenas com um resíduo de lisina ou histidina, formando uma díade catalítica. Ou, em alguns casos, a serina pode ser combinada com um par de resíduos de histidina para formar uma nova tríade catalítica. Nesta classe de enzimas, o nucleófilo ataca a porção carbonila da ligação peptídica e forma um intermediário acil-enzima. Além disso, o sítio catalítico pode ser inativado por inibidores específicos como o fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF). Funcionalmente, participam de reações pós-transducionais das cadeias polipeptídicas e atuam em sua maioria, como endopeptidases na ativação de zimogênios, como é o caso da tripsina (PAGE; DICERA, 2008).

As treonina proteases, possuem uma tríade catalítica semelhante a da serina protease, mas, com uma composição diferente, constituída por resíduos de lisina, ácido glutâmico e treonina como nucleófilo. Neste caso, o grupo hidroxilo do resíduo de treonina desempenha o papel de receptor de prótons, papel realizado pela histidina no caso das serina proteases. As treonina proteases são consideradas como hidrolases nucleófilas N-terminais, ou seja, o sítio ativo está localizado na porção N-terminal de sua estrutura. O exemplo mais conhecido desta classe de enzimas é uma estrutura denominada de proteossoma que está presente dentro das células e é responsável por clivar grandes proteínas intracelulares, o que facilita assim a reciclagem dos aminoácidos (WLODAWER, 1995; MOFFITT; MARTIN; WALKER, 2010).

As cisteína proteases estão entre as principais proteases encontradas em vírus, bactérias, protozoários, plantas (papaína) e mamíferos em geral. Estas enzimas agem em sua maioria como endopeptidases, porém, algumas cisteína proteases atuam exclusivamente como exopeptidases. Além disso, apresentam um mecanismo catalítico semelhante às serina proteases. Seu sítio ativo é composto por um grupo sulfidril de um resíduo de cisteína como nucleófilo e sua atividade depende de uma díade de cisteína e histidina, na qual o resíduo de histidina funciona como doador de prótons e base geral. Neste caso, o grupo imidazol da histidina polariza o grupo

sulfidrila da cisteína e permite a desprotonação, mesmo em condições de pH neutro ou ligeiramente ácido, para que ocorra a ativação do nucleófilo (OTTO; SCHIRMEISTER, 1997; OLIVER-SALVADOR et al., 2011).

As metaloproteases apresentam grande importância biológica do ponto de vista médico e estão envolvidas em processos como proliferação e diferenciação celular, migração e remodelagem da matriz extracelular e vascularização. Sua atividade catalítica depende da presença de íons metálicos divalentes, principalmente o zinco, ou seja, se no meio reacional houver outro tipo de íon metálico, estas enzimas podem ter sua atividade inibida. A inibição pode ocorrer também pela presença de agentes quelantes como o ácido etilenodiamino tetracético (EDTA). Outros íons divalentes como o  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , também podem ser utilizados para a ativação do sítio catalítico. Os íons metálicos estão ligados em uma conformação quase tetraédrica no sítio ativo, onde, três resíduos de aminoácidos carregados estão ligados ao núcleo metálico, juntamente com uma molécula de água utilizada para a hidrólise. As metaloproteases podem atuar como exopeptidases na remoção de grupos amino-terminal ou carboxi-terminal, ou, como endopeptidases como é o caso das metaloproteases de matriz (MMPs) (MOFFITT; MARTIN; WALKER, 2010).

As aspártico proteases, também conhecidas como proteases ácidas, apresentam em seu sítio ativo uma díade catalítica formada por dois resíduos de aspartato. Suas cadeias laterais carboxiladas estão envolvidas no processo catalítico. Estas enzimas, em geral, apresentam atividades em condições ácidas de pH, como é o caso da pepsina e da renina, por causa da necessidade do seu mecanismo de catálise expressar um dos seus resíduos de aspartato protonado e o outro desprotonado. Neste mecanismo, ocorre o ataque nucleofílico de uma molécula de água no grupo carbonilo da ligação peptídica, com a formação de um intermediário gem-diol tetraédrico. A desprotonação da molécula de água é feita pelo resíduo aspartil desprotonado e, a protonação do oxigênio presente no grupo carbonilo clivável, pelo resíduo de aspartil protonado. A pepstatina A é utilizada como inibidor para essa classe de enzimas, uma vez que, a hidroxila presente em um de seus aminoácidos substitui a molécula de água no sítio ativo e permite que ocorra a clivagem da ligação peptídica. Estas enzimas agem apenas como endopeptidases e são alvos terapêuticos para o tratamento de doenças como AIDS e Alzheimer (SUSSMAN et al., 2013).

Enzimas da família glutâmico proteases foram recentemente descobertas, como é o caso da “*scytalido glutâmico peptidase*”, primeira enzima classificada dentro desta família. Esta enzima apresenta uma estrutura terciária composta por duas cadeias antiparalelas e uma díade catalítica composta pelos resíduos Glicina53 (Gln53) e Glutamina136 (Glu136). O mecanismo catalítico mais provável envolve o ataque nucleofílico de uma molécula de água ativada pela base geral (Glu136), ao átomo de carbono do grupo carbonilo, para a formação de um intermediário tetraédrico. A estabilização eletrofílica do complexo de transição é realizada pelo grupo amino da cadeia lateral da Gln53 e a protonação do nitrogênio envolvido na ligação peptídica é realizada pelo grupo carboxila protonado da Glu136. Biologicamente, este grupo de enzimas atua, por exemplo, sob moléculas de insulina e angiotensina (ODA, 2012).

### **3.4. Peptídeos biologicamente ativos**

Substâncias provenientes de alimentos, que apresentam atividades biológicas, correspondem aos nutrientes presentes nos alimentos ingeridos que podem auxiliar processos e funções regulatórias no organismo humano ou animal, independentemente de suas propriedades nutricionais (MEISEL; BOCKELMANN, 1999)

A hidrólise que ocorre nas proteínas é fundamental para melhorar suas propriedades funcionais, imunológicas, sensoriais e bioativas, o que torna os hidrolisados proteicos, substâncias com maior valor agregado em comparação a sua proteína nativa. Desta forma, o grau e o tipo de hidrólise enzimática estão diretamente relacionados com as propriedades das proteínas que foram hidrolisadas (CHEISON et al., 2009).

Peptídeos biologicamente ativos podem ser liberados tanto durante o processo de digestão gastrointestinal das proteínas presentes nos alimentos, quanto pela utilização de enzimas proteolíticas exógenas. Estas moléculas são definidas em geral como sequências curtas de aminoácidos (2-20) que exercem benefícios fisiológicos quando consumidas. Além disso, a utilização de enzimas endógenas (fora do processo digestivo) e exógenas, é capaz de gerar resultados satisfatórios devido à especificidade da reação e a obtenção de produtos com características físicas e funcionais determinadas, sem que ocorra danos ou destruição de aminoácidos (RODRIGUÉZ-DÍAZ et al., 2011).

Peptídeos bioativos derivados de caseína apresentam diversas atividades biológicas e auxiliam várias funções fisiológicas dos organismos. Atividades antimicrobianas e antioxidantes, funções anticoagulantes, anti-hipertensivas e imunomoduladoras são descritas para estas moléculas. Estas substâncias são obtidas principalmente por hidrólise enzimática e frequentemente adicionadas nos alimentos, para uma melhoria funcional das suas propriedades nutricionais. Muitas enzimas como a tripsina, quimotripsina e pepsina, são utilizadas para hidrolisar caseínas e obter peptídeos bioativos essenciais (SU et al., 2012).

Ultimamente, em decorrência dos benefícios específicos de peptídeos associados à saúde, como por exemplo, a redução dos processos de alergia, a utilização destes compostos em alimentos funcionais e bebidas, tanto para a suplementação de proteína, quanto para a utilização clínica, tem aumentado de forma considerável (RAO et al., 2012).

#### **3.4.1. Peptídeos antimicrobianos**

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são geralmente moléculas catiônicas que contém de 12 a 50 resíduos de aminoácidos, que interagem com os fosfolipídios aniônicos da membrana microbiana, o que confere seletividade a estes peptídeos. Além da seletividade, a rara indução à resistência microbiana e a capacidade de sinergia com antibióticos convencionais tornam os PAMs atrativos, como agentes antimicrobianos (PALUMBO et al., 2010). Estas moléculas podem retardar o crescimento de bactérias e possuem papel importante no sistema de defesa de muitas espécies animais (WU et al., 2013).

Apresentam diferentes comprimentos, sequência de aminoácidos, cargas aniônicas ou catiônicas e diferenças estruturais. Apesar dessas diversidades, essas moléculas possuem algumas características em comum, como por exemplo, a natureza anfipática dos seus sítios ativos. Devido as suas propriedades antimicrobianas de largo espectro, estes peptídeos foram rapidamente propostos como substâncias com ação antimicrobiana para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos (BROGDEN; BROGDEN, 2011).

A caseicidina é um dos primeiros peptídeos antimicrobianos descritos e purificados que apresentou efeito de inibição contra estirpes de *Staphylococcus* spp., *Sarcina* spp., *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* (SILVA; MALCATA, 2005). A israicidina, derivada da fração  $\alpha_{s1}$ -da caseína (F1-23:

Arg-Pro-Lis-His-Pro-Ile-Lis-His-Gln-Gli-Leu-Pro-Gln-Glu-Val-Leu-Asn-Glu-Asn-Leu-Arg-Phe) apresenta, além de atividade antimicrobiana, funções imunomoduladoras e podem atuar como peptídeo opióide no sistema nervoso. Portanto, como se pode observar, os efeitos dos peptídeos bioativos são encontrados dentro de sequências específicas das frações da caseína (PHELAN et al., 2009).

Os PAMs adotam com frequência estruturas anfipáticas, com suas subunidades hidrofóbicas lado a lado, as quais correspondem a mais de 50% de seus aminoácidos constitutivos. Dessa forma, quando catiônicos e hidrofóbicos, tendem a ter maior facilidade em interagir e se inserir em paredes celulares aniônicas ou em membranas fosfolipídicas dos micro-organismos (BROWN; HANCOCK, 2006).

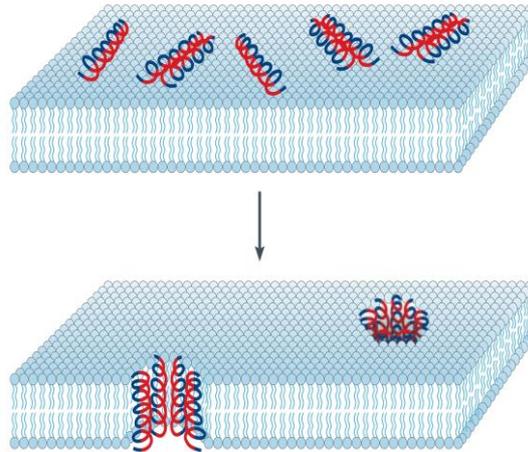
Estes peptídeos podem ser classificados de acordo com seu desdobramento estrutural como  $\alpha$ -hélice, folha- $\beta$ , estendido e alça; e caracterizados de acordo com suas propriedades físico-químicas, tais como carga, hidrofobicidade, sequência e anfipaticidade (PETERS et al., 2010).

A atividade antimicrobiana destes peptídeos pode ser resultado da perturbação da integridade da membrana celular por meio de interações eletrostáticas e hidrofóbicas que levam à formação de poros na membrana (HUANG; HUANG; CHEN, 2010).

Alguns modelos de inserção e permeabilização das membranas plasmáticas dos micro-organismos pelos PAMs foram criados a fim de explicar o mecanismo de ação que confere aos peptídeos o caráter antimicrobiano. É conhecido que em etapa anterior à inserção dos peptídeos nas membranas plasmáticas dos micro-organismos há a atração destes pela membrana, em que os PAMs catiônicos são eletrostaticamente atraídos pelas cargas negativas do envelope externo de bactérias Gram-negativas; e dos fosfolipídios aniônicos e grupos fosfatos na superfície das bactérias Gram-positivas (BROGDEN, 2005).

Existem três modelos propostos pela literatura. O modelo *barrel stave* (Figura 3) ocorre pela fixação dos peptídeos em hélice nas membranas plasmáticas, na qual há a formação de um feixe na membrana com um lúmen central, o que se assemelha a um barril, onde as regiões hidrofóbicas dos peptídeos se alinham com o núcleo lipídico da bicamada da membrana, ao passo que a face hidrolítica do peptídeo forma a porção interna de um poro aquoso (BROGDEN, 2005). Esse tipo de mecanismo leva à morte da célula por extravasamento do conteúdo celular (NASCIMENTO et al., 2003).

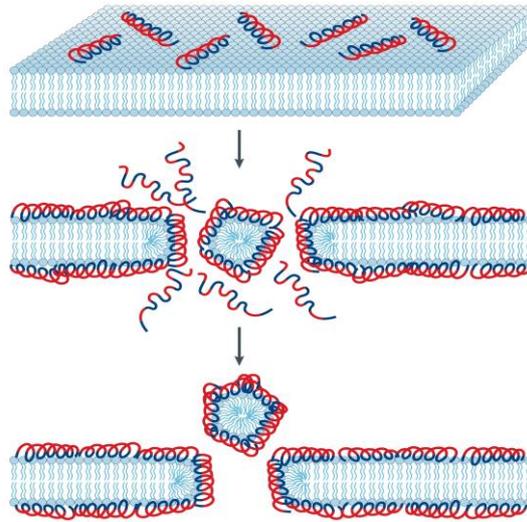
**Figura 3** – Modelo *barrel stave* de atividade antimicrobiana.



Fonte: Brogden (2005).

Já no modelo *carpet* (Figura 4) há o acúmulo de peptídeos na superfície da bicamada, que se orientam paralelamente à superfície da membrana e são atraídos eletrostaticamente por elas, de modo que sua porção hidrofílica sofra atração pelas cabeças aniônicas dos grupos fosfolipídicos em inúmeros locais que recobrem a superfície da membrana, formando uma espécie de tapete. Em altas concentrações de peptídeos, estes são orientados paralelamente à superfície e então reorientados, de forma que sua porção hidrofílica se direcione ao centro hidrofóbico da membrana e, ainda mantenha contato com as cabeças aniônicas dos grupos fosfolipídicos (BROGDEN, 2005). Semelhante a uma ação detergente que leva à formação de micelas, os peptídeos causarão perturbação na bicamada, com a desagregação da membrana (NASCIMENTO et al., 2003).

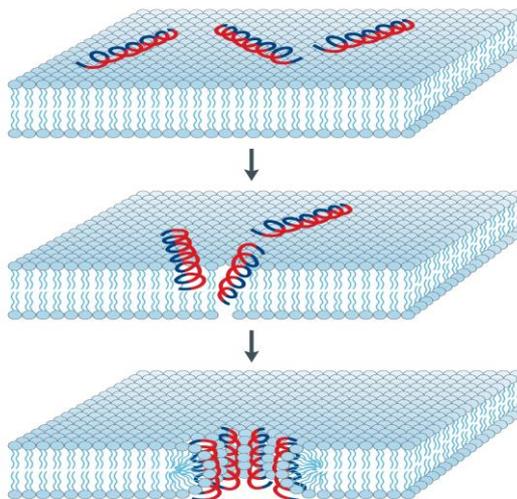
**Figura 4** – Modelo *carpet* de atividade antimicrobiana.



Fonte: Brogden (2005).

Em relação ao modelo *toroidal* (Figura 5), os peptídeos em  $\alpha$ -hélice se orientam paralelamente à membrana e, após atingirem um limiar de concentração, inserem-se de forma perpendicular à camada lipídica, o que induz as monocamadas a se dobrarem de forma contínua através dos poros, de modo que o núcleo aquoso esteja revestido pelos peptídeos inseridos e pelas cabeças dos grupos lipídicos. Na formação do poro toroidal, as faces polares dos peptídeos associam-se com as cabeças polares dos grupos lipídicos.

**Figura 5** – Modelo *toroidal* de atividade antimicrobiana.



Fonte: Brogden (2005).

Ao final do processo, ocorre a formação de um poro aquoso, seletivo a íons, cuja parede é constituída por monômeros do peptídeo intercalados com lipídios da membrana biológica. O modelo *toroidal* difere do *barrel stave*, pois, os monômeros dos peptídeos estão sempre associados às cabeças dos grupos lipídicos (BROGDEN, 2005). Esses peptídeos com atividade antimicrobiana também podem ser caracterizados como multifuncionais, quando apresentam mais de uma atividade biológica, como por exemplo a atividade antioxidante (WU et al., 2013).

### 3.4.2. Peptídeos antioxidantes

Radicais livres são substâncias químicas capazes de existir de forma independente e apresentar um ou mais orbitais com elétrons desemparelhados gerados durante o metabolismo celular normal, ou influenciados pela exposição de fatores externos, como por exemplo, cigarro, poluentes do ar, raios-X e produtos químicos industriais. O metabolismo oxidativo é responsável por gerar tanto os radicais livres, quanto outras espécies reativas de oxigênio (ROS) (LAFARGA; HAYES, 2014).

Uma gama de espécies reativas de oxigênio, que incluem radicais livres como o ânion superóxido ( $O_2^\bullet$ ), radicais hidroxila ( $\bullet HO$ ) e radicais não-livres, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), podem ser formados no corpo humano e em alimentos (PERJÉS et al., 2012). Estes radicais não só induzem a peroxidação lipídica que causa deterioração de alimentos, mas também danos oxidativos em biomoléculas, que pode levar à morte da célula, dano tecidual e doenças crônicas como arteriosclerose, câncer, enfisema, cirrose e artrite (HE et al., 2012).

Antioxidantes são substâncias que atuam sob essas espécies reativas, para impedir suas ações, e são definidos como compostos que quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável são capazes de inibir ou retardar a sua oxidação. Antioxidantes naturais, como o ácido rosmarínico, catequina, tocoferóis, ácido ascórbico, entre vários extratos fenólicos advindos de plantas, são muito utilizados em alimentos processados, por exemplo. Contudo, a busca por antioxidantes naturais tem se estendido além dessas fontes tradicionais e vários estudos têm mostrado que peptídeos e hidrolisados protéicos de origem vegetal e animal podem possuir significativa atividade antioxidante (XUE et al., 2009).

Neste caso, peptídeos com atividades antioxidantes são capazes de inativar espécies reativas de oxigênio, eliminar os radicais livres, quelar metais, reduzir hidroperóxidos e eliminar oxidantes específicos dos alimentos. Estas moléculas são utilizadas como antioxidantes potencialmente multifuncionais, o que confere um aumento do valor nutricional das dietas. Fatores como, a fonte de proteína, tipo de enzima proteolítica e do processamento da hidrólise (pH, temperatura e tempo), são determinantes na composição de aminoácidos, sequência aminoacídica e consequentemente potencial de atividade antioxidante (CASTRO; SATO, 2014).

O interesse em encontrar compostos antioxidantes encontra-se em constante crescimento ao longo dos anos, principalmente aqueles presentes em alimentos, pois estas substâncias podem proteger o corpo humano contra o ataque dos radicais livres e atrasar o progresso de muitas doenças crônicas, bem como impedir a oxidação lipídica em alimentos (KADRI et al., 2011).

Das proteínas de origem animal, a caseína, bem como seus hidrolisados e peptídeos, é muito estudada quanto à atividade antioxidante. Alguns autores sugerem a importância de resíduos de leucina, que pode estar relacionada à eliminação de radicais (KIM; JANG; KIM, 2007; XIE et al., 2013), à atividade quelante de íons e à inibição da oxidação em lipídios (PHELAN et al., 2009).

De forma geral, os 20 aminoácidos encontrados nas proteínas, possuem a capacidade de interagir com radicais livres se a energia destes for alta o suficiente. Entre os mais reativos estão os aminoácidos nucleofílicos que contém enxofre (cisteína e metionina), os aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) e a histidina por conter um grupamento imidazólico. Contudo, de forma isolada não são considerados eficazes como moléculas antioxidantes. Portanto, a atividade proteolítica pouco específica em alimentos tende a reduzir o potencial antioxidante das proteínas presentes nestas matrizes. A maior atividade antioxidante de peptídeos em comparação a aminoácidos livres ocorre pela maior estabilidade dos aminoácidos na cadeia para interagir com as moléculas de radicais livres e impedir que estas se propaguem (SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011).

Em geral, peptídeos antioxidantes derivados de alimentos apresentam massa molecular que varia entre 500-1800 Da e apresenta em sua maioria, resíduos de valina ou leucina na extremidade N-terminal, que por serem hidrofóbicos, se concentram na interface entre as camadas lipídicas e a fase aquosa, o que facilita o acesso e a eliminação dos radicais livres. Outros resíduos como prolina, histidina, tirosina,

triptofano, metionina e cisteína, também são importantes na sequência aminoacídica para esta atividade (SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011).

Peptídeos com atividade antioxidante podem ser obtidos por hidrólise e são afetados diretamente pelo tipo de hidrólise pela qual a proteína precursora foi submetida. Esses peptídeos podem ser produzidos a partir das seguintes formas: (a) hidrólise enzimática por enzimas digestivas, (b) fermentação de leite com culturas proteolíticas iniciadoras e; (c) proteólise através de enzimas produzidas por micro-organismos ou plantas (KORHONEN, 2009).

### **3.4.3. Peptídeos anti-hipertensivos**

Os distúrbios da pressão arterial corpórea representam um dos principais problemas de saúde na atualidade. Neste caso, a hipertensão arterial possui proporções epidêmicas e afeta aproximadamente cerca de 30% da população adulta mundial. Além disso, é considerada uma alteração fisiológica crônica que carrega um fator de risco para outras enfermidades, como por exemplo, a arterosclerose, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e insuficiência renal (BALTI et al., 2015).

A enzima conversora de angiotensina (ECA) é uma das principais moléculas responsáveis pela regulação da pressão arterial periférica e sua consequente homeostase eletrolítica. A ECA, uma dipeptidilcarboxipeptidase ancorada na membrana, encontra-se diretamente relacionada aos sistemas renina-angiotensina e caliceína-quinina, e é responsável pela conversão do dodecapeptídeo inativo angiotensina I ao octapeptídeo angiotensina II, um potente vasoconstritor. Além disso, a enzima ainda regula os níveis de peptídeos bioativos endógenos, como é o caso da bradiquinina, um nonapeptídeo que funciona como vasodilatador e é inibido pela ECA, e das encefalinas e substância P, moléculas inibidoras competitivas de substratos para a ECA (RAWENDRA et al., 2013; BALTI et al., 2015).

Os medicamentos sintéticos como o captopril, enalapril e benazepril são amplamente utilizados para inibir a ECA e controlar a pressão arterial. Entretanto, podem apresentar efeitos secundários, como reações alérgicas, erupções cutâneas e alterações do paladar. Desta forma, é de fundamental interesse a descoberta de novas moléculas inibidoras da ECA que possam ser utilizadas de forma alternativa ou como coadjuvantes às drogas sintéticas (RAWENDRA et al., 2013).

Em geral, a maioria dos peptídeos que apresentam atividade inibidora da ECA possuem entre 2 e 12 aminoácidos, uma vez que estudos de cristalografia realizados

por Natesh et al. (2003), demonstraram que o sítio ativo da enzima não é capaz de se acoplar a moléculas peptídicas grandes.

A intensidade da atividade anti-hipertensiva está diretamente relacionada à estrutura do peptídeo e, a sequência dos três primeiros aminoácidos presentes na porção C-terminal desempenha a principal resposta na ligação com o sítio ativo da ECA. Neste sentido, aminoácidos hidrofóbicos ou aromáticos de cadeia lateral ramificada são preferíveis na extremidade C-terminal para que ocorra a ligação competitiva. Foi demonstrado que a inibição da ECA é mais eficaz quando há presença de aminoácidos como tirosina, fenilalanina, triptofano, prolina, isoleucina e valina, além de resíduos de leucina, que aumentam significativamente o processo de inibição da ECA. Dados da literatura demonstram ainda que o potencial positivo de resíduos de arginina e lisina também contribuem para potencializar este efeito inibidor (HERNÁNDEZ-LEDESMA; CONTRERAS; RECIO, 2011).

Os principais peptídeos descritos que apresentam elevada atividade de inibição da ECA são o IPP e o VPP, peptídeos derivados da fração  $\beta$ -caseína a partir da fermentação de *Lactobacillus helveticus* (NAKAMURA et al., 1995; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2014).

Os peptídeos inibidores de angiotensina desempenham um importante papel fisiológico na regulação da hipertensão, pois, uma vez que a concentração de angiotensina diminui no sistema circulatório, têm-se conseqüentemente uma diminuição na pressão arterial. Algumas evidências sugerem que, o aumento na ingestão de proteínas, reduz a pressão sanguínea, o que fundamenta as alternativas não-farmacológicas tanto para a prevenção, quanto para o controle da pressão arterial sistêmica, um dos mais importantes fatores de risco de doenças cardiovasculares (COSTA; GONTIJO; NETTO, 2007; WU et al., 2013).

### **3.5. Peptídeos derivados da caseína também podem apresentar efeitos nocivos**

As proteínas presentes no leite já são bem estudadas e apontam cientificamente tanto efeitos benéficos, quanto, efeitos nocivos (Tabela 1). Um exemplo claro de efeito prejudicial é encontrado no peptídeo denominado de casomorfina, o qual apresenta ação análoga a um opióide que atua como liberador de histamina. Existem diversos tipos de casomorfina que diferem basicamente pelos seus efeitos narcóticos. A  $\beta$ -casomorfina foi apontada como uma molécula que é

capaz de aumentar os sintomas de doenças como autismo e esquizofrenia (JINSMAA; YOSHIKAWA, 1999; EFSA, 2009).

**Tabela 1** – Peptídeos bioativos derivados de proteínas do leite.

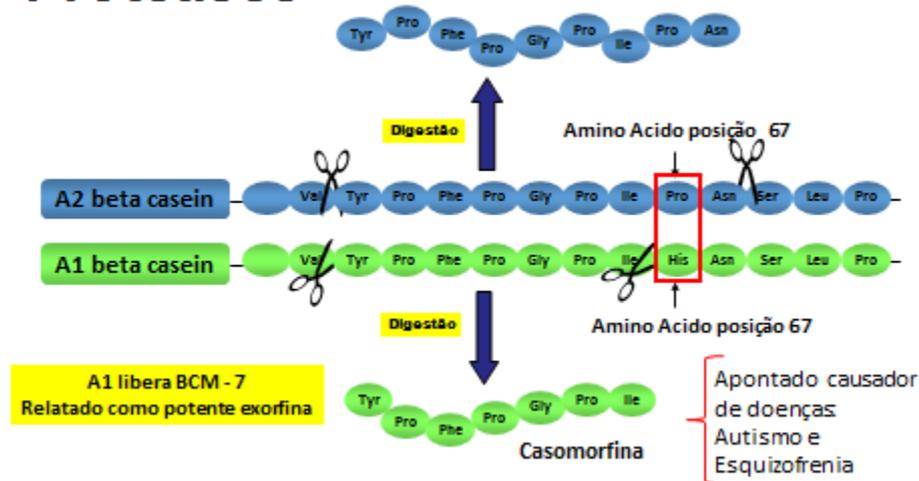
<b>Peptídeo Bioativo</b>	<b>Proteína Precursora</b>	<b>Bioatividade</b>
Casomorfina	$\alpha$ -, $\beta$ -Caseína	Opióide agonista
$\alpha$ -Lactorfina	$\alpha$ -Lactalbumina	Opióide agonista
$\beta$ -Lactorfina	$\beta$ -Lactoglobulina	Opióide agonista
Lactoferroxina	Lactoferrina	Opióide antagonista
Casoxina	$\kappa$ -Caseína	Opióide antagonista
Casoquinina	$\alpha$ -, $\beta$ -Caseína	ECA-inibidor
Lactoquinina	$\alpha$ -Lactalbumina, $\beta$ -Lactoglobulina, albumina sérica	ECA-inibidor
Imunopeptídeos	$\alpha$ -, $\beta$ -Caseína	Imunomodulador
Lactoferrina	Lactoferrina	Antimicrobiano
Caseicina	$\alpha_{S2}$ -Caseína	Antimicrobiano
Israicina	$\alpha_{S1}$ -Caseína	Antimicrobiano
Casoplatelina	$\kappa$ -Caseína	Antitrombótico
Fosfopeptídeos	$\alpha$ -, $\beta$ -Caseína	Quelante mineral

Fonte: Meisel; Bockelmann. (1999).

As casomorfina podem ser liberadas através do processo de digestão gastrointestinal ao ingerir a proteína do leite  $\beta$ -caseína A1. Neste contexto, vale salientar que existem duas variantes genéticas da  $\beta$ -caseína, denominadas de A1 e A2 (Figura 6). Estas proteínas diferenciam-se pela troca, na posição 67, do aminoácido histidina (A1) por prolina (A2). Um ou ambos os tipos desta proteína podem ser expressos no leite de vaca, o que depende da composição genética dos animais individuais. Também estão associados ao leite do tipo A1, distúrbios gastrointestinais e supressão na proliferação dos linfócitos. O tipo  $\beta$ -caseína A1 é o mais comum encontrado no leite de vaca na Europa (exceto a França), Estados Unidos, Austrália e Nova Zelândia. Entretanto, a  $\beta$ -caseína expressa em humanos, cabras, ovelhas e búfalas são consideradas como “A2-like”, ou seja, não apresentam a liberação de casomorfina no processo de digestão gastrointestinal (JIANQIN et al., 2016).

**Figura 6** – Liberação de casomorfina a partir da  $\beta$ -caseína A1 do leite de vaca.  $\beta$ -caseína A1 e A2 são variantes genéticas da proteína  $\beta$ -caseína do leite de vaca e se diferem por um aminoácido (A2 = Pro, A1 = His).

## Proteases



Para identificar estas duas variantes um teste genético foi desenvolvido pela “a2 Milk Company”, que determina se uma vaca produz leite com a proteína  $\beta$ -caseína do tipo A2 ou A1. Este teste permite que a empresa certifique os produtores de leite como produtor predominante de proteína de  $\beta$ -caseína A2 em seu leite.

A “a2 Milk Company”, por meio de melhoramento genético animal desenvolveu animais produtores do “leite A2” (leite de vaca), que contém predominantemente o tipo A2 da  $\beta$ -caseína. Este tipo de leite está licenciado e é comercializado pela “a2 Milk Company” e vendido principalmente na Austrália, Nova Zelândia, China, Estados Unidos e Reino Unido. A “a2 milk” é uma marca registrada, mas o nome é frequentemente empregado para discutir leite com predominância de  $\beta$ -caseína A2.

Nos Estados Unidos, uma dieta sem glúten e sem caseína (leite e derivados) foi recomendada em conferências para pais de crianças com autismo. Em livros, sites e grupos de discussão há relatos que descrevem os benefícios dessa dieta contra o autismo, especialmente no desenvolvimento da interação social e habilidades verbais desses pacientes (MILLWARD et al., 2004). No entanto, estes estudos podem ainda não ser definitivos, por apresentarem algumas dúvidas, uma vez que esses peptídeos não puderam ser detectados nas amostras de urina dessas crianças (EFSA, 2009).

## 4. REFERÊNCIAS

AQUINO, R. S.; LEMOS, C. G.; ALENCAR, C. A.; SILVA, E. G.; LIMA, R. S.; GOMES, J. A. F.; SILVA, A. F. A realidade da caprinocultura e ovinocultura no semiárido brasileiro: um retrato do sertão do Araripe, Pernambuco. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia – PUBVET**, v. 10, n. 4, p. 271-281, abr. 2016.

ARTEMOVA, N. V.; BUMAGINA, Z. M.; KASAKOV, A. S.; SHUBIN, V. V.; GURVITS, B. Y. Opioid peptides derived from food proteins suppress aggregation and promote reactivation of partly unfolded stressed proteins. **Peptides**, v. 31, p. 332–338, 2010.

BALLABIO, C.; CHESSA, S.; RIGNANESE, D.; GIGLIOTTI, C.; PAGNACCO, G.; TERRACCIANO, L.; FIOCCHI, A.; RESTANI, P.; CAROLLI, A. M. Goat milk allergenicity as a function of  $\alpha$ S1-casein genetic polymorphism. **Journal Dairy of Science**, v. 94, p. 998–1004, 2011.

BALTI, R.; BOUGATEF, A.; SILA, A.; GUILLOCHON, D.; DHULSTER, P.; NEDJAR-ARROUME, N. TEMPORARY REMOVAL: Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potente active peptide in spontaneously hypertensive rats. **Food Chemistry**, v. 170, p. 519–525, 2015.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Proteases. **Encyclopedia of Life Sciences**, 2007.

BROGDEN, K., A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 238-250, 2005.

BROGDEN, N. K.; BROGDEN, K.; A. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 217– 225, 2011.

BROWN, K. L.; HANCOCK, R. E. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, p. 24-36, 2006.

BRUNO, M. A.; LAZZA, C. M.; ERRASTI, M. E.; LÓPEZ, L. M. I.; CAFFINI, N. O.; PARDO, M. F. Milk clotting and proteolytic activity of na enzyme preparation from

*Bromelia hieronymi* fruits. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 695–701, 2010.

CASTRO, H. C.; ABREU, P. A.; GERALDO, R. B.; MARTINS, R. C. A.; SANTOS, R.; LOUREIRO, N. I. V.; CABRAL, L. M.; RODRIGUES, C. R. Looking at the proteases from a simple perspective. **Journal of Molecular Recognition**, v. 24, p. 165-181, 2011.

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

CHALAMAIAH, M.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYAI, T.; DIWAN, P. V.; KUMAR, P. U.; NIMGULKAR, C.; KUMAR, B. D. Immunomodulatory effects of protein hydrolysates from rohu (*Labeo rohita*) egg (roe) in BALB/c mice. **Food Research International**, v. 62, p. 1054–1061, 2014.

CHEISON, S. C.; ZHANG, S. B.; WANG, Z.; XU, S. Y. Comparison of a modified spectrophotometric and the pH-stat methods for determination of the degree of hydrolysis of whey proteins hydrolysed in a tangential-flow filter membrane reactor. **Food Research International**, v. 42, p. 91–97, 2009.

CHOI, J.; SABIKHI, L.; HASSAN, A.; ANAND, S. Bioactive peptides in dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, p. 1-12, 2012.

COSTA, E. L.; GONTIJO, J. A. R.; NETTO, F. M. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 632–640, 2007.

DADSHAHI, Z.; HOMAEI, A.; ZEINALI, F.; SAJEDI, R. H.; KHAJEH, K. Extraction and purification of a highly thermostable alkaline caseinolytic protease from wastes *Penaeus vannamei* suitable for food and detergent industries. **Food Chemistry**, v. 202, p. 110–115, 2016.

DAN, C.; NA, Z.; XUE-MEI, N.; QING-ZHANG, L.; XUE-JUN, G. Potential genes for regulation of milk protein synthesis in dairy goat mammary gland. **Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)**, v. 23, p. 50-56, 2016.

DI BERNARDINI, R.; HARNEDY, P.; BOLTON, D.; KERRY, J.; O'NEILL, E.; MULLEN, A. M.; HAYES, M. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1296–1307, 2011.

EFSA. Review of the potential health impact of  $\beta$ -casomorphins and related peptides. **EFSA Scientific Report**, v. 231, p. 1-107, 2009.

ELZOGHBY, A. O.; EL-FOTOH, W. S. A.; ELGINDY, N. A. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 153, p. 206–216, 2011.

GONÇALVES, H. C.; SILVA, M. A.; WECHSLER, F. S.; RAMOS, A. A. Genetic and Environmental Factors Affecting Milk Production from Dairy Goats. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 719-729, 2001.

GONZALEZ-JORDAN, A.; THOMAR, P.; NICOLAI, T.; DITTMER, J. The effect of pH on the structure and phosphate mobility of casein micelles in aqueous solution. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 88-94, 2015.

HADDAR, A.; FAKHFAKH-ZOUARI, N.; HMIDET, N.; FRIKHA, F.; NASRI, M.; KAMOUN, A. S. Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavenensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, p. 288-294, 2010.

HAM, J. S.; LEE, S. G.; JEONG, S. G.; OH, M. H.; KIM, D. H.; PARK, Y. W. Characteristics of Korean-Saanen goat milk caseins and somatic cell counts in comparison with Holstein cow milk counterparts. **Small Ruminant Research**, v. 93, p. 202–205, 2010.

HE, R.; JU, X.; YUAN, J.; LIFENG W. L.; GIRGIH, A. T.; ALUKO, R. E. Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. **Food Research International**, v. 49, p. 432-438, 2012.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; CONTRERAS, M. D. M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, n. 1, p. 23–35, 2011.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; GARCÍA-NEBOT, M. J.; FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; AMIGO, L.; RECIO, I. Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. **International Dairy Journal**, v. 38, n. 2, p. 82–100, 2014.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; BERGMANN, C. W.; LOERA-CORRAL, O.; ROJO-DOMÍGUEZ, A.; HUERTA-OCHOA, S.; REGALADO GONZÁLEZ, C.; PARADO-BARRAGÁN, L. A. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2001–2006, 2011.

HOMAEI, A.; LAVAJOO, F.; SARIRI, R. Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 88, p. 542–552, 2016.

HUANG, Y.; HUANG, J.; CHEN, Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function. **Protein and Cell**, v.1, n. 2, p. 143–152, 2010.

JIANQIN, S.; XU, L.; LU, X.; YELLAND, G. W.; NI, J.; CLARKE, A. J. Effects of milk containing only A2 beta casein *versus* milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk. **Nutrition Journal**, v. 15, p. 1-16, 2016.

JINSMAA, Y.; YOSHIKAWA, M. Enzymatic release of neocasomorphin and b-casomorphin from bovine b-casein. **Peptides**, v. 20, p. 957–962, 1999.

KADRI, A.; CHOBBA, I. B.; ZARAI, Z.; BÉKIR, A.; GHARSALLAH, N.; DAMAK, M.; GDOURA, R. Chemical constituents and antioxidant activity of the essential oil from aerial parts of *Artemisia herba-alba* grown in Tunisian semi-arid region. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 2923–2929, 2011.

KIM, G.; JANG, H.; KIM, C. Antioxidant capacity of caseinophosphopeptides prepared from sodium caseinate using alcalase. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1359–1365, 2007.

KORHONEN, H. Bioactive components in bovine milk. In **Bioactive Components in Milk and Dairy Products**, (Y. Park, Ed.), Ames, IA: Wiley-Blackwell, p. 15-42, 2009.

LAFARGA, T.; HAYES, M. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: Generation, functionality and application as functional ingredients. **Meat Science**, v. 98, n. 2, p. 227–239, 2014.

LISSEON, M.; LOCHNIT, G.; ERHARDT, G. *In vitro* gastrointestinal digestion of bovine  $\alpha_{S1}$ - and  $\alpha_{S2}$ -casein variants gives rise to different IgE-binding epitopes. **International Dairy Journal**, v. 34, p. 47-55, 2014.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 30433-30437, 2008.

LÓPEZ-OTIN, C.; OVERALL, C. M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 3, p. 509-519, 2002.

MADUREIRA, A. R.; TAVARES, T.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. *Invited review*: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. **Journal Dairy of Science**, v. 93, p. 437–455, 2010.

MEISEL, H. Bioactive substances of food origin: a challenge for food and nutrition science. **Nahrung Weinheim**, v. 43, n. 3, p. 147, 1999.

MEISEL, H.; BOCKELMANN, W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 76, p. 207-215, 1999.

MERHEB-DINI, C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; DA SILVA, R. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucorindicae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucorindicae-seudaticae*N31). **Food Chemistry**, v. 120, p. 87–93, 2010.

MILLWARD, C.; FERRITER, M.; CALVER, S.; CONNELL-JONES, G. Gluten- and casein-free diets for autistic spectrum disorder. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2, p. 1-12, 2004.

MOFFITT, K. L.; MARTIN, L.; WALKER, B. Proteases implicated in apoptosis: old and new. **Journal of Pharmacy and Phamacology**, v. 62, p. 563–576, 2010.

MONTALBANO, M.; SEGRETO, R.; DI GERLANDO, R.; MASTRANGELO, S.; SARDINA, M. T. Quantitative determination of casein genetic variants in goat milk: Application in Girgentana dairy goat breed. **Food Chemistry**, v. 192, p. 760–764, 2016.

NAIR, P. K.; ALEXANDER, M.; DALGLEISH, D.; CORREDIG, M. Physico-chemical properties of casein micelles in unheated skim milk concentrated by osmotic stressing: Interactions and changes in the composition of the serum phase. **Food Hydrocolloids**, v. 34, p. 46-53, 2014.

NAKAMURA, Y.; YAMAMOTO, N.; SAKAI, K.; OKUBO, A.; YAMAZAKI, S.; TAKANO, T. Purification and characterization of antiotensin-I-converting enzyme inhibitors from sour milk. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 777-783, 1995.

NASCIMENTO, A. C. C.; FONTES, W.; SEBEN, A.; CASTRO, M. S. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. **Protein and Peptides Letters**, v. 10, p. 227-238, 2003.

NATESH, R.; SCHWAGER, S. L. U.; STURROCK, E. D.; ACHARYA, K. R. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. **Nature**, v. 42, p. 551-554, 2003.

ODA, K. New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. **Journal of Biochemistry**, v. 151, n. 1, p. 13–25, 2012.

OLIVER-SALVADOR, M. C.; LIAN, Z.; LAURSEN, R. A.; BOLAÑOS-GARCÍA, V. M.; SORIANO-GARCÍA, M. Biochemical characterisation of MX-4, a plant cysteine protease of broad specificity and high stability. **Food Chemistry**, v. 126, p. 543–552, 2011.

OTTO, H. H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. **Chemistry Review**, v. 97, p. 133-171, 1997.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: Classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 1220-1236, 2008.

PALUMBO, D.; IANNACCONE, M.; PORTA, A.; CAPPARELLI, R. Experimental antibacterial therapy with puriindolines, lactoferrin and lysozyme in *Listeria monocytogenes*-infected mice. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 538-545, 2010.

PAZZOLA, M.; DETTORI, M. L.; PIRA, E.; NOCE, A.; PASCHINO, P.; VACCA, G. M. Effect of polymorphisms at the casein gene cluster on milk renneting properties of the Sarda goat. **Small Ruminant Research**, v. 117, p. 124–130, 2014.

PERJÉS, Á.; KUBIN, A. M.; KÓNYI, A.; SZABADOS, S.; CZIRÁKI, A.; SKOUMAL, R.; RUSKOAHO, H.; SZOKODI, I. Physiological regulation of cardiac contractility by endogenous reactive oxygen species. **Acta Physiologica**, v. 205, p. 26–40, 2012.

PETERS, B. M.; SHIRTLIFF, M. E.; JABRA-RIZK, M. A. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? **PLoS Pathogens**, v. 6, p. 1-4, 2010.

PHELAN, M.; AHERNE, A.; FITZGERALD, R. J.; O'BRIEN, M. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 643–654, 2009.

RAO, S. Q.; JU, T.; SUN, J.; SU, Y. J.; XU, R. R.; YANG, Y. J. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysate of hen egg white lysozyme. **Food Research International**, v. 46, p. 127–134, 2012.

RAWENDRA, R. D. S.; AISHA; CHANG, C. I.; AULANNI'AM; CHEN, H. H.; HUANG, T. C.; HSU, J. L. A novel angiotensin converting enzyme inhibitory peptide derived from proteolytic digest of Chinese soft-shelled turtle egg white proteins. **Journal of Proteomics**, v. 94, p. 359–369, 2013.

RODRIGUÉZ-DÍAZ, J. C.; KUROZAWA, L. E.; NETTO, F. M.; HUBINGER, M. D. Optimization of the enzymatic hydrolysis of blue shark skin. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 938-949, 2011.

ROJAS-RONQUILLO, R.; CRUZ-GUERRERO, A.; FLORES-NÁJERA, A.; RODRÍGUEZ-SERRANO, G.; GÓMEZ-RUIZ, L.; REYES-GRAJEDA, J. P.; JIMÉNEZ-GUZMÁN, J.; GARCÍA-GARIBAY, M. Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. **International Dairy Journal**, v. 26, p. 147–154, 2012.

SAAVEDRA, L.; HEBERT, E. M.; MINAHK, C.; FERRANTI, P. An overview of “omic” analytical methods applied in bioactive peptide studies. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 925–934, 2013.

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, n. 4, p. 229–254, 2011.

SCHMIDT, V.; PINTO, A. T.; SCHNEIDER, R. N.; SILVA, F. F. P.; MELLO, F. A. Caracterização da mastite subclínica em caprinos produzidos em sistema orgânico no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 774-778, 2009.

SILVA, S. V.; MALCATA, F. X. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1–15, 2005.

STRATTON, L. M.; VELLA, M. N.; SHEESHKA, J.; DUNCAN, A. M. Food neophobias related to factors associated with functional food consumption in older adults. **Food Quality and Preference**, v. 41, p. 133-140, 2015.

SU, R.; LIANG, M.; QI, W.; LIU, R.; YUAN, S.; HE, Z. Pancreatic hydrolysis of bovine casein: Peptide release and time-dependent reaction behavior. **Food Chemistry**, v. 133, p. 851–858, 2012.

SUSSMAN, F.; VILLAVERDE, M. C.; DOMÍNGUEZ, J. L.; DANIELSON, U. H. On the active site protonation state in aspartic proteases: implications for drug design. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, p. 4257-4275, 2013.

TAVANO, L. O. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1– 11, 2013.  
THOMAR, P.; NICOLAI, T. Dissociation of native casein micelles induced by sodium caseinate. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 224-231, 2015.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 11-24, 2012.

UMAYAPARVATHI, S.; MEENAKSHI, S.; VIMALRAJ, V.; ARUMUGAM, M.; SIVAGAMI, G.; BALASUBRAMANIAN, T. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostreacucullata*). **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 343–353, 2014.

UYAR, F.; PORSUK, I.; KIZIL, G.; YILMAZ, E. I. Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* strain CA15. **EurAsian Journal of BioSciences**, v. 5, p. 1-9, 2011.

VO, T. S.; RYU, B.; KIM, S. K. Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p.1336–1346, 2013.

WLODAWER, A. Proteasome: a complex protease with a new fold and a distinct mechanism. **Structure**, v. 3, p. 417-420, 1995.

WU, S.; QI, W.; LI, T.; LU, D.; SU, R.; HE, Z. Simultaneous production of multi functional peptides by pancreatic hydrolysis of bovine casein in an enzymatic membrane reactor via combinational chromatography. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2944–2951, 2013.

XIE, N.; WANG, C.; AO, J.; LI, B. Non-gastrointestinal-hydrolysis enhances bioavailability and antioxidant efficacy of casein as compared with its *in vitro* gastrointestinal digest. **Food Research International**, v. 51, p. 114-122, 2013.

XUE, Z.; YU, W.; LIU, Z.; WU, M.; KOU, X.; WANG, J. Preparation and antioxidative properties of a rapeseed (*Brassica napus*) protein hydrolysate and three peptide fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5287–5293, 2009.

YAZDI, S. R.; CORREDIG, M. Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles. A fluorescence spectroscopy study. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1143–1149, 2012.

YIKE, I. Fungal proteases and their pathophysiological effects. **Mycopathologia**, v. 171, p. 299–323, 2011.

## **CAPÍTULO II:**

**Avaliação das atividades biológicas de peptídeos liberados pela hidrólise da caseína caprina por proteases fúngicas**

## **Avaliação das atividades biológicas de peptídeos liberados pela hidrólise da caseína caprina por proteases fúngicas**

José Erick Galindo Gomes<sup>a</sup>, Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento<sup>b</sup>, Cristina Maria de Souza-Motta<sup>c</sup>, Eleni Gomes<sup>a</sup>, Maria Manuela Estevez Pintato<sup>d</sup>, Keila Aparecida Moreira<sup>b</sup>, Roberto da Silva<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE – UNESP – Rua Cristóvão Colombo 2265, São José do Rio Preto, São Paulo, CEP 15054-000, Brasil.

<sup>b</sup>Laboratório de Microbiologia, Tecnologia Enzimática e Bioprodutos – Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE - Avenida Bom Pastor, s/n.º, Garanhuns, Pernambuco, CEP 55292-278, Brasil

<sup>c</sup>Departamento de Micologia, Centro de Biociências – UFPE – Av. Prof. Nelson Chaves s/n, Recife, Pernambuco, CEP 50670–420, Brasil

<sup>d</sup>Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa/Porto, Rua Arquiteto Lobão Vital, Apartado 2511, 4200 Porto, Portugal.

\*Autor de correspondência: [dasilva@ibilce.unesp.br](mailto:dasilva@ibilce.unesp.br)

**Resumo:** Os fungos filamentosos *Penicillium decumbens* URM 6018, *Aspergillus viride-nutans* URM 6629, *Mucor guilliermondii* URM 5848, *Mucor subtilissimus* URM 4133 e *Mucor sp.* URM 4146, foram selecionados para hidrolisar a caseína caprina. Para esta finalidade, planejamentos fatoriais 2<sup>3</sup> foram utilizados. Os ensaios com as proteases sintetizadas pelos fungos *Mucor subtilissimus* URM 4133 e *Mucor guilliermondii* URM 5848 obtiveram os maiores valores de grau de hidrólise (GH), o que variou entre 71,81%±5,91 e 71,54%±0,66, respectivamente. Os peptídeos liberados foram analisados quanto às suas atividades biológicas e apresentaram atividade antimicrobiana frente a todas as bactérias Gram-negativas nas frações entre 3 kDa e 10 kDa. Para a atividade antioxidante a fração de hidrolisados provenientes da ação da protease do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848 apresentou 100% de sequestro do radical livre ABTS\*. Já para a atividade anti-hipertensiva os hidrolisados do *Mucor guilliermondii* URM 5848 e do *Mucor subtilissimus* URM 4133 foram capazes de inibir a ECA com valores de 19,47%±0,06 e 15,91%±0,01, respectivamente para as frações < 3 kDa.

**Palavras-chave:** Grau de hidrólise, planejamentos fatoriais, peptídeos bioativos.

## 1. INTRODUÇÃO

O leite caprino possui propriedades biológicas específicas em comparação ao leite de vaca e ao leite humano, como por exemplo, menor tamanho de glóbulos de gordura, alcalinidade distinta e alta capacidade de tamponamento. Com relação às proteínas presentes no leite de cabra, estas também apresentam uma melhor digestibilidade, conseqüentemente, ocorre uma maior absorção dos aminoácidos em comparação ao leite de vaca (AHMED et al., 2015).

A produção de leite de origem não bovina tem aumentado de forma simultânea ao redor do mundo e corresponde a cerca de 15% da produção mundial. Esse crescimento também encontra-se atrelado ao aumento de interesses culturais, ecológicos e econômicos (RANI; POOJA; PAL, 2017). Tendo em vista que, a maior parte do leite não bovino e seus derivados apresentam além de suas funções nutricionais, diversas propriedades terapêuticas, os peptídeos biologicamente ativos presentes nas proteínas do leite de cabra, como a caseína, se destacam por apresentarem funções antimicrobianas (OSMAN et al., 2016), antioxidantes (SMIALOWSKA; MATIA-MERINO; CARR, 2017) e anti-hipertensivas (TAGLIAZUCCHI et al., 2017).

A caseína, proteína predominante no leite, é composta por um grupo heterogêneo de fosfoproteínas que estabilizam o fosfato de cálcio em estruturas micelares e dividida em quatro frações principais ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseína) (NAIR et al., 2014). A hidrólise que ocorre nestas proteínas é fundamental para melhorar suas propriedades funcionais, imunológicas, sensoriais e bioativas, o que torna os hidrolisados proteicos substâncias com maior valor agregado em comparação a sua proteína nativa (CHEISON et al., 2009).

Esta hidrólise é responsável por liberar peptídeos bioativos e pode ser realizada tanto durante o processo de digestão gastrointestinal das proteínas, quanto através da via proteolítica de enzimas exógenas provenientes de micro-organismos ou de fontes vegetais (BRUNO et al., 2010). A utilização de proteases endógenas fora do processo digestivo, ou de proteases exógenas, é capaz de gerar resultados mais vantajosos devido a especificidade da reação e a obtenção de produtos com

características físicas e funcionais determinadas, sem que ocorra danos ou destruição de aminoácidos (RODRIGUÉZ-DÍAZ et al., 2011).

As enzimas proteolíticas produzidas por micro-organismos, como os fungos filamentosos, são muito utilizadas em vários tipos de indústrias (alimentícia, farmacêutica, detergentes) para a hidrólise de proteínas com diversas finalidades. No caso da indústria de alimentos, estas enzimas são utilizadas principalmente, para promover a melhoria do valor nutricional e funcional dos produtos comercializados, como é o caso da caseína e do soro de leite hidrolisados (SOUZA et al., 2015).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade das enzimas proteolíticas produzidas por diferentes espécies de fungos filamentosos na hidrólise da caseína caprina, bem como, o potencial dos peptídeos liberados em desempenhar atividades biológicas antimicrobianas, antioxidantes e anti-hipertensivas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Micro-organismos**

A partir de um banco de micro-organismos com 70 fungos filamentosos, disponibilizados pela Micoteca URM do Departamento de Micologia/Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, descritos como produtores de proteases, foi feito um levantamento bibliográfico daqueles que não apresentam produção de micotoxinas, o que resultou em um número de 12 espécies utilizadas inicialmente. As cinco espécies que apresentaram maior produção de enzimas proteolíticas foram selecionadas para dar continuidade ao trabalho. Estes fungos foram mantidos em tubos de ensaio com o meio de cultura ágar extrato de malte e repicados a cada trinta dias. O meio de cultura utilizado para esporulação foi o batata dextrose ágar (BDA).

### **2.2. Produção de proteases**

Para a seleção dos cinco melhores fungos produtores de proteases, foi utilizado o meio de produção MS-2 descrito por Porto, Campos-Takaki e Lima Filho (1996), modificado. O meio foi composto por extrato de soja (1,5%), farelo de trigo (0,5%),  $K_2HPO_4$  (0,435%),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,06%) e glicose (0,25%). O inóculo foi padronizado a  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> e os meios de produção realizados em triplicata. As fermentações ocorreram em frascos Erlenmeyers de 125 mL de capacidade, que continham 25 mL

do meio de fermentação esterilizados a 121 °C, por 20 minutos. Após a inoculação, os sistemas foram mantidos em incubadora refrigerada sob agitação (150 rpm) por 96 horas a 37 °C. Transcorrido este período, foram filtrados e centrifugados (4000 x g) a 4 °C e o sobrenadante denominado como extrato enzimático bruto, posteriormente utilizado para as determinações analíticas.

### **2.3. Atividade proteolítica e proteína total**

A determinação da atividade proteolítica ocorreu de acordo com o método descrito por Leighton et al. (1973), utilizando a azocaseína 1% (m/v), diluída em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2, como substrato. A reação foi realizada em microtubos de 2 mL, onde, 60 µL do extrato enzimático foram adicionados a 100 µL do substrato com incubação na ausência de luz durante 1 hora. Posteriormente, 480 µL de ácido tricloroacético 10% (m/v) foram adicionados a mistura reacional e os microtubos centrifugados durante 5 minutos a 3000 x g e 4 °C. Logo após, 320 µL do sobrenadante foram misturados a 560 µL de hidróxido de sódio 1 M. A atividade enzimática foi definida como a variação de 0,01 na absorvância a 440 nm em espectrofotômetro durante uma hora. As dosagens enzimáticas foram expressas em U.mL<sup>-1</sup>, e todos os ensaios realizados em triplicata.

Para determinar as proteínas totais das amostras foi utilizado o método descrito por Bradford (1976). Neste caso, 50 µL do extrato enzimático, foram adicionados a 1,5 mL do reagente de Bradford. A curva de calibração foi preparada com soro albumina bovina (BSA) como padrão, processada em uma gama de concentrações (10-1000 µg.mL<sup>-1</sup>). Estas soluções foram submetidas à leitura em espectrofotômetro a 595 nm. As dosagens de proteína foram expressas em mg.mL<sup>-1</sup> e todos os ensaios realizados em triplicata.

### **2.4. Preparação da caseína caprina**

O leite cru foi obtido de um rebanho leiteiro de cabras da raça Saanen do Capril Rio Preto, localizado no município de São José do Rio Preto – SP e imediatamente armazenado a 4 °C. O processo de obtenção da caseína caprina, na forma de caseinato de sódio, ocorreu por meio da metodologia proposta por Egito et al. (2006).

Inicialmente, o leite foi desnatado por centrifugação (2100 x g por 30 min a 32 °C) e a caseína total, preparada mediante precipitação isoelétrica em pH 4,2 com HCl 1 M. O precipitado foi obtido pela centrifugação a 2200 x g por 20 min, a 10 °C, lavado

três vezes com água destilada e solubilizado em pH 7,0 por meio da adição de NaOH 1 M. Esse ciclo de precipitação-lavagem-dissolução se repetiu por mais duas vezes. O precipitado de caseína foi dialisado contra água ultrapura a 4 °C, por 72 h e a solução de caseína liofilizada e estocada a -20 °C.

## 2.5. Hidrólise da caseína caprina

A caseína caprina foi dissolvida para uma concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup> em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5, de acordo com a metodologia proposta por Egito et al. (2007). Para a hidrólise desta proteína, foi realizado planejamento fatorial 2<sup>3</sup> para cada um dos extratos enzimáticos brutos produzidos pelos cinco diferentes fungos filamentosos.

O planejamento fatorial completo baseado no modelo de primeira ordem envolve a triagem de um grande número de variáveis que podem influenciar a resposta a ser avaliada em poucos ensaios. Um conjunto de 12 experimentos, com quatro pontos centrais e três variáveis independentes, foi realizado, para cada micro-organismo de forma distinta (5 planejamentos fatoriais 2<sup>3</sup>), com o intuito de identificar quais variáveis afetaram significativamente o grau de hidrólise (GH) da caseína caprina e conseqüentemente, quais as melhores condições para esta hidrólise.

Para os fungos URM 4133, URM 5848, URM 6018 e URM 6629, o comportamento do sistema foi explicado pela equação linear (equação 1).

$$Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \beta_{23}BC + \varepsilon \quad (1)$$

Em que,  $Y$  representa a variável resposta,  $\beta_0$  o intercepto,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  os coeficientes lineares,  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  e  $\beta_{23}$  os coeficientes de interação,  $A$ ,  $B$  e  $C$  as variáveis independentes, e  $\varepsilon$  o erro experimental.

Já para o fungo URM 4146, o comportamento do sistema foi explicado pela equação linear (equação 2).

$$Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \beta_{23}BC + \beta_{123}ABC + \varepsilon \quad (2)$$

Em que,  $Y$  representa a variável resposta,  $\beta_0$  o intercepto,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  os coeficientes lineares,  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$ ,  $\beta_{23}$  e  $\beta_{123}$  os coeficientes de interação,  $A$ ,  $B$  e  $C$  as variáveis independentes, e  $\varepsilon$  o erro experimental.

Vale salientar que, cada planejamento estatístico foi feito de acordo com a atividade proteolítica de cada micro-organismo, a fim de proporcionar cargas enzimáticas semelhantes para todos. Portanto, entre os planejamentos, houve variação apenas na proporção Enzima/Substrato (Tabela 1) e os demais parâmetros (temperatura e tempo de hidrólise) permaneceram iguais para todos. Após a hidrólise, a reação enzimática foi interrompida por choque térmico, no qual, as amostras foram submetidas a banho fervente durante 10 minutos para a desnaturação das proteases.

### 2.6. Determinação do grau de hidrólise (GH)

O grau de hidrólise, definido como a quantidade de ligações peptídicas clivadas, ou o número de grupos amino formados durante o processo de hidrólise, foi determinado de acordo com a metodologia proposta por Adler-Nissen (1979), com o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Para a reação, 250 µL das amostras do hidrolisado de caseína, foram incubados com 2 mL de tampão fosfato de sódio, 0,2125 M, pH 8,2 e 2 mL do TNBS 0,1% (v/v) diluído em água ultrapura. A reação ocorreu a 50 °C durante 60 minutos. Transcorrido este período, foram adicionados 4 mL de HCl 0,1N para interromper a reação. A mistura reacional foi mantida em temperatura ambiente durante 30 minutos e analisada em espectrofotômetro a 340 nm. A curva de calibração foi realizada com L-leucina como aminoácido padrão e variou suas concentrações entre 0,25 – 10 mM. O GH (%) foi calculado de acordo com a equação 3:

$$GH(\%) = \left( \frac{AN_2 - AN_1}{N_{pb}} \right) * 100 \quad (3)$$

AN<sub>1</sub> corresponde ao conteúdo de nitrogênio amino antes da hidrólise em mg.g<sup>-1</sup> de proteína, AN<sub>2</sub> corresponde ao conteúdo de nitrogênio amino depois da hidrólise em mg.g<sup>-1</sup> de proteína. E N<sub>pb</sub>, corresponde ao conteúdo total de nitrogênio amino presente contido nas ligações peptídicas do substrato proteico. Vale salientar que os valores de AN<sub>1</sub> e AN<sub>2</sub> foram obtidos com base na curva padrão gerada com L-leucina, e N<sub>pb</sub>, de acordo com a metodologia de Micro-Kjeldahl (AOAC, 1990).

### 2.7. Eletroforese Tricina-SDS-PAGE dos hidrolisados

As amostras para a eletroforese foram preparadas utilizando a quantidade de 40 µL de cada solução dos hidrolisados e 960 µL de tampão de amostra composto por 40% (v/v) de água deionizada, 20% (v/v) de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, 24% (v/v) de glicerol, 10% (v/v) de dodecil sulfato de sódio a 10%, 2% (v/v) de β-mercaptoetanol e 4% (v/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250 à 0,5%. Foi utilizado o marcador molecular (Amersham ECL High-Range Rainbow Molecular Weight Markers. Cod. RPN756E - GE Healthcare) que apresenta proteínas com variação de massa molecular entre 12 – 225 kDa. A eletroforese Tricina-SDS-PAGE dos hidrolisados e da caseína não hidrolisada transcorreu segundo Schagger e Jagow (1987), com algumas modificações. O gel de concentração foi composto por 4,9% de poli-acrilamida e o gel de corrida 15,4%. A migração eletroforética das proteínas presentes nas amostras foi realizada a 190 V, durante 40 minutos.

O processo de coloração do gel ocorreu em duas etapas. Primeiramente, o gel foi incubado durante 30 minutos com a uma solução fixadora composta por 40% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético. Posteriormente, o gel foi corado com uma solução que continham 10% (v/v) de ácido acético e 0,25 g (m/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250, durante 1 hora. O gel foi descorado com uma solução a 10% (v/v) de ácido acético. Após este procedimento, foi realizada uma segunda etapa de coloração com nitrato de prata para a detecção de bandas com baixa massa molecular.

## **2.8. Avaliação das atividades biológicas dos hidrolisados**

Para a realização dos testes de atividades biológicas, os hidrolisados que apresentaram maior grau de hidrólise foram centrifugados inicialmente a 5000 x g a 4 °C e o sobrenadante utilizado para obtenção de duas frações peptídicas, uma com massa molecular entre 3 kDa e 10 kDa, e outra com massa molecular menor que 3 kDa, por meio do Amicon Ultra-15 (Merck Millipore).

### **2.8.1. Atividade antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana das frações de peptídeos (3 kDa – 10 kDa e < 3 kDa) foi realizada pelo método de turbidez descrito por Mine, Ma e Lauriau (2004) com modificações. Foram utilizadas três bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138 e *Bacillus subtilis* UFPEDA 86) e três Gram-negativas (*Escherichia coli* UFPEDA 224, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA

396 e *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416), cedidas pela Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

Para a determinação da atividade antimicrobiana, as colônias de bactérias foram ativadas em 10 mL de caldo triptona de soja (TSB) e incubadas a 37 °C durante 15 horas. A suspensão de cada bactéria foi inoculada em caldo TSB até atingir escala logarítmica de crescimento determinada por absorvância a 620 nm e padronizada uma quantidade de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Microplacas de 96 poços de fundo plano, de poliestireno e estéreis (Corning®), foram utilizadas para o ensaio. A mistura de 50 µL (4 mg.mL<sup>-1</sup>) de cada fração de peptídeos foi adicionada a 45 µL de caldo Mueller Hinton (CMH) e 5 µL da suspensão bacteriana. O controle positivo apresentou apenas CMH e suspensão bacteriana e o controle negativo continha cloranfenicol na concentração de 300 µg.mL<sup>-1</sup>. Após a incubação das placas a 37 °C durante 24 horas, a leitura procedeu-se em leitora de microplaca a 620 nm.

### 2.8.2. Atividade antioxidante

A atividade sequestradora de radicais livres das frações de peptídeos foi determinada com o radical cátion ABTS<sup>•+</sup>, gerado a partir do 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) de acordo com Re et al. (1999) modificada. Para formação do radical ABTS<sup>•+</sup>, persulfato de potássio e ABTS foram preparados a uma concentração final de 2,45 e 7 mM, respectivamente, e incubado ao abrigo da luz por 16 h a temperatura ambiente. A absorvância da solução do radical foi ajustada para  $0,70 \pm 0,02$  a 734 nm, através de espectrofotômetro, por diluição em tampão fosfato-salino (PBS) 100 mM, pH 7,4. Para a reação, 50 µL (4 mg.mL<sup>-1</sup>) das amostras foram misturados com 950 µL da solução do radical ABTS<sup>•+</sup>. Os ensaios foram incubados a 30 °C durante seis minutos e lidos a 734 nm em triplicata. A curva padrão foi obtida com Trolox (20-500 µM) como antioxidante padrão, para avaliar a eficiência das frações. A atividade antioxidante (%) foi calculada em relação à atividade de eliminação do radical, de acordo com a equação 4:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \left( \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \times 100$$

(4)

Em que,  $A_{\text{controle}}$  representa a absorvância inicial do ABTS e  $A_{\text{amostra}}$  a absorvância após a adição da respectiva amostra com os peptídeos.

Além do método com ABTS, também foram realizados ensaios de atividade antioxidante utilizando outro radical livre, o 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). A avaliação da atividade sequestradora do radical livre DPPH foi realizada segundo a metodologia descrita por Li et al. (2013), com algumas modificações. O radical DPPH (0,2 mM) foi preparado com uma solução composta por 30% água e 70% etanol. Neste caso, 750  $\mu\text{L}$  de amostra foram misturados a 750  $\mu\text{L}$  da solução que continha o radical DPPH. A reação ocorreu durante 30 minutos ao abrigo de luz e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 517 nm. A curva padrão foi preparada com ácido ascórbico (1-10 mM) como antioxidante. E a atividade antioxidante (%) foi calculada utilizando a mesma fórmula da metodologia de ABTS.

### 2.8.3. Atividade anti-hipertensiva

A atividade anti-hipertensiva foi realizada segundo a metodologia descrita por Holmquist et al. (1979) com algumas modificações propostas por Asoodeh, Yazdi e Chamani (2012), que utilizaram o N-[3-(2-Furil) acrilóil-Phe-Gly-Gly (FAPGG) como substrato. O ensaio foi realizado pela mistura de 22  $\mu\text{L}$  da ECA (50  $\text{mU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 50  $\mu\text{L}$  da amostra (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 100  $\mu\text{L}$  do substrato (0,5 mM) e 150  $\mu\text{L}$  de tampão ECA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 0,3 M de NaCl e 1 mM de  $\text{ZnCl}_2$ ). A mistura reacional foi incubada durante 60 min. e a leitura realizada a 340 nm. A amostra controle foi feita substituindo a amostra por tampão ECA. Para o cálculo da atividade anti-hipertensiva (%), foi utilizada a equação 5:

$$\text{Inibição da ECA (\%)} = \left[ 1 - \left( \frac{\Delta A_{\text{inibidor}}}{\Delta A_{\text{controle}}} \right) \right] * 100 \quad (5)$$

### 2.9. Análise estatística

A análise estatística do grau de hidrólise para os planejamentos fatoriais  $2^3$  foi processada no software Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA), para indicar os efeitos estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ), e ajuste do modelo aos dados experimentais. Todos os experimentos foram realizados de forma aleatória.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Produção de proteases

A avaliação da produção de proteases a partir da fermentação submersa com o meio MS-2, mostrou que os fungos, *Mucor subtilissimus* URM 4133, *Mucor sp.* URM 4146, *Mucor guilliermondii* URM 5848, *Aspergillus viride-nutans* URM 6629 e o *Penicillium decumbens* URM 6018, apresentaram as maiores atividades proteolíticas, como pode ser observado na Tabela 2. Com o auxílio da atividade específica estas espécies foram selecionadas para as etapas posteriormente descritas. Lima et al. (2011) trabalharam com o meio MS-2 para a produção de uma protease colagenolítica a partir do fungo *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 e obtiveram atividade máxima de  $164 \text{ U.mL}^{-1}$  por meio de planejamento fatorial  $2^4$ . Já para a avaliação da atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato, o ensaio apresentou uma atividade de  $5,2 \text{ U.mL}^{-1}$ .

### 3.2. Grau de hidrólise (GH)

As enzimas proteolíticas de todos os fungos filamentosos foram eficientes para hidrolisar a caseína caprina, como pode ser observado nos resultados do GH demonstrados na Figura 1. Pode-se constatar que o ensaio 7 (Relação E/S = -1; Temperatura = +1 e Tempo = +1) apresentou as melhores condições, ou seja, o maior percentual de grau de hidrólise em todos os casos. Para o GH do *Penicillium decumbens* URM 6018 o valor máximo de hidrólise foi de  $33,59\% \pm 0,71$  e a análise de variância (Tabela 3) demonstrou que as variáveis: relação E/S e tempo, além da interação entre estas, foram estatisticamente significativas. Neste caso, o ajuste do modelo foi medido pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), que apresentou valor de 0,9189 e  $R^2_{\text{ajuste}} = 0,8216$ , indicando que 91,89% da variação total do grau de hidrólise foi explicado pelo modelo estatístico.

Para o fungo *Aspergillus viride-nutans* URM 6629 o GH no ensaio 7 foi de  $60,14\% \pm 2,13$  e a análise de variância (Tabela 4) demonstrou que todas as variáveis independentes foram estatisticamente significativas. O ajuste do modelo foi medido pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e apresentou um valor de 0,9892 e  $R^2_{\text{ajuste}} = 0,9762$ , ou seja, 98,92% da variação total do grau de hidrólise foi explicado pelo modelo estatístico. Para o fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848 o GH máximo apresentou valor de  $71,54\% \pm 0,66$  e demonstrou na análise de variância (Tabela 5) que, todas as variáveis independentes, e a interação entre a relação enzima substrato e tempo, foram estatisticamente significativas. O ajuste do modelo foi medido pelo

coeficiente de determinação ( $R^2$ ), que apresentou valor de 0,9883 e  $R^2_{ajuste} = 0,9743$ , desta forma, 98,83% da variação total do grau de hidrólise foi explicado pelo modelo estatístico.

Para o grau de hidrólise do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133, pode-se observar na Figura 1, valor máximo de  $71,81\% \pm 5,91$ . Este foi o maior GH observado dentre todos os fungos utilizados. A análise de variância (Tabela 6) demonstrou que as variáveis: relação E/S e tempo, além das interações entre a relação E/S e o tempo, e a relação E/S e a temperatura, foram estatisticamente significativas. Neste caso, o ajuste do modelo foi medido pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), que apresentou um valor de 0,9334 e  $R^2_{ajuste} = 0,8534$ , indicando que 93,33% da variação total do grau de hidrólise foi explicado pelo modelo estatístico.

O fungo *Mucor sp.* URM 4146 apresentou GH máximo de  $49,02\% \pm 3,34$ , a análise de variância para este planejamento fatorial mostrou que apenas a variável independente tempo, foi estatisticamente significativa (Tabela 7). No entanto, o ajuste do modelo medido pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), apresentou valor de 0,5854. Ou seja, apenas 58,54% da variação total do grau de hidrólise, foi possível ser explicada, o que indica uma falta de ajuste ao modelo estatístico.

As equações ajustadas dos modelos estatísticos utilizados para a análise dos planejamentos fatoriais foram as seguintes:

*Penicillium decumbens* URM 6018

$$GH (\%) = 11,0251 + 11,2713 \cdot R + 0,8306 \cdot Tp - 0,2007 \cdot Tr - 0,3686 \cdot R \cdot Tp - 0,2928 \cdot R \cdot Tr + 0,0040 \cdot Tp \cdot Tr \quad (6)$$

*Aspergillus viride-nutans* URM 6629

$$GH (\%) = -21,0724 + 5,0407 \cdot R + 0,1699 \cdot Tp + 0,6979 \cdot Tr - 0,2611 \cdot R \cdot Tp - 0,3088 \cdot R \cdot Tr + 0,0367 \cdot Tp \cdot Tr \quad (7)$$

*Mucor guilliermondii* URM 5848

$$GH (\%) = -12,1528 + 10,9858 \cdot R + 1,9076 \cdot Tp + 0,9508 \cdot Tr - 0,5843 \cdot R \cdot Tr - 0,4045 \cdot R \cdot Tp - 0,0212 \cdot Tp \cdot Tr \quad (8)$$

*Mucor subtilissimus* URM 4133

$$GH (\%) = 43,1908 + 29,7789 \cdot R - 1,4107 \cdot Tp - 0,4640 \cdot Tr - 0,6833 \cdot R \cdot Tp - 0,7403 \cdot R \cdot Tr + 0,0658 \cdot Tp \cdot Tr \quad (9)$$

*Mucor sp.* URM 4146

$$GH (\%) = 28,8591 - 81,0160 \cdot R + 0,5230 \cdot Tp - 0,2592 \cdot Tr + 5,0816 \cdot R \cdot Tp + 2,3957 \cdot R \cdot Tr + 0,0111 \cdot Tp \cdot Tr - 0,1555 \cdot R \cdot Tp \cdot Tr \quad (10)$$

Em que, GH é o grau de hidrólise (%), R é a relação Enzima/Substrato, Tp é o tempo (h) e Tr a Temperatura (°C).

Para os efeitos avaliados pela diferença entre a soma das respostas obtidas no maior nível (+) e no menor nível (-) de cada variável, os dados estatísticos mostraram que o fator tempo (h) foi positivo para os planejamentos fatoriais de todos os fungos (Figura 2). Ou seja, a utilização de um maior tempo no processo de hidrólise é capaz de aumentar o GH sem que as enzimas percam sua eficiência catalítica. Contudo, a relação E/S apresentou efeito negativo para todas as análises, dessa forma, um nível menor de relação E/S é necessário para que se tenha incremento na variável resposta GH. Este fato pode estar relacionado com os parâmetros cinéticos das enzimas na hidrólise, uma vez que, o substrato pode saturar os sítios catalíticos e desta forma, reduzir a velocidade máxima ( $V_{max}$ ) da reação. A Figura 2 mostra ainda que apenas os planejamentos estatísticos dos fungos *Penicillium decumbens* URM 6018 e *Mucor sp.* URM 4146 apresentaram influências negativas da temperatura sendo necessária a redução deste parâmetro para o aumento do GH.

Devido os ensaios 7 terem apresentado maior GH para todos os planejamentos fatoriais realizados, estes ensaios foram utilizados para a realização das atividades biológicas.

### 3.3. Eletroforese Tricina-SDS-PAGE dos hidrolisados

As diferentes condições de hidrólise em que a caseína foi submetida com relação à proporção de E/S, tempo e temperatura de hidrólise, influenciou diretamente na atuação das proteases frente ao substrato. Pode ser observado o perfil de degradação da caseína em eletroforese Tricina-SDS-PAGE, nas Figuras 3, 4, 5, 6 e

7. Neste caso, as enzimas em geral, apresentaram melhores resultados de hidrólise quando submetidas a temperaturas mais elevadas e durante um maior tempo, como observado na análise do GH.

O perfil de degradação para as enzimas produzidas pelos fungos *Penicillium decumbens* URM 6018, *Aspergillus viride-nutans* URM 6629, *Mucor guilliermondii* URM 5848, se mostra bastante característico (Figura 3, 4 e 5), já para os fungos *Mucor subtilissimus* URM 4133 e *Mucor sp.* URM 4146, pode ser observada semelhança na degradação. Segundo Elzoghby, El-Fotoh e Elgindy (2011), a facilidade de clivagem da caseína ocorre pelo fato desta proteína apresentar uma estrutura aberta devido à alta concentração dos resíduos de prolina, os quais dificultam a formação de uma grande quantidade de estruturas secundárias, uma vez que os resíduos de prolina interrompem a formação de  $\alpha$ -hélice e folhas  $\beta$ , além de não haver pontes de dissulfeto na estrutura na caseína, tornando-as mais frágeis e mais susceptíveis ao ataque das proteases.

### **3.4. Avaliação das atividades biológicas dos hidrolisados**

#### **3.4.1. Atividade antimicrobiana**

Para a atividade antimicrobiana, observa-se que, as frações com massa molecular entre 3 kDa e 10 kDa, geradas pela ação das proteases de todos os fungos, apresentaram os melhores resultados e foram capazes de inibir o crescimento de todas as bactérias Gram-negativas, como pode ser observado na Tabela 8. Os peptídeos presentes no hidrolisado proveniente da protease do fungo *Penicillium decumbens* URM 6018, não apresentaram atividade frente a nenhuma bactéria Gram-positiva. Entretanto, há um grande potencial de atividade biológica dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise da caseína caprina, como agentes antimicrobianos.

Silva, Sarmiento e Pintado (2013) relataram que grande parte dos peptídeos com atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, apresentam uma característica de se associar com cargas aniônicas das peptideoglicanas presentes na parede celular e portanto, são denominados de peptídeos aniônicos. Segundo Yount e Yeaman (2013), as bactérias Gram-positivas apresentam várias camadas de proteoglicanas, intercaladas com ácido teicóico e lipoteicóico que conferem esta característica de carga negativa.

As frações com massa molecular < 3 kDa, foram menos eficientes frente as bactérias utilizadas (Tabela 8). Portanto, acredita-se que, os peptídeos com maior

capacidade de inibição do crescimento destas bactérias patogênicas apresentam massa molecular entre 3 - 10 kDa. Arruda et al. (2012), trabalhando com uma protease proveniente do látex da *Jacaratia corumbensis*, encontraram valores de inibição do crescimento das bactérias *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* apenas com uma concentração de peptídeos de 62,5 mg.mL<sup>-1</sup>.

Tang et al. (2015), analisaram a atividade antimicrobiana de hidrolisados de caseína por pepsina comercial, frente a bactérias patogênicas e obtiveram resultados para *Salmonella entérica* subsp. *serovar Typhimurium* ATCC 14028 (20 mg.mL<sup>-1</sup>), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (15 mg.mL<sup>-1</sup>) e *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (20 mg.mL<sup>-1</sup>). Assim, observa-se que as proteases sintetizadas por fungos filamentosos apresentam grande potencial na liberação de peptídeos antimicrobianos a partir da caseína caprina, uma vez que, foi obtida inibição de crescimento microbiano em uma concentração muito menor (4 mg.mL<sup>-1</sup>).

#### **3.4.2. Atividade antioxidante**

Todas as frações de peptídeos provenientes dos hidrolisados de caseína caprina analisadas, apresentaram capacidade de eliminação dos radicais livres ABTS<sup>•+</sup> e DPPH, como pode ser observado na Tabela 9. O hidrolisado protéico da protease do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848 apresentou 100% de sequestro do radical livre ABTS<sup>•+</sup> no ensaio com a fração entre 3 kDa-10 kDa e também o maior percentual de sequestro do DPPH. As frações com massa molecular < 3 kDa, apresentaram uma menor capacidade de sequestro de radicais comparado as frações de massa molecular entre 3 kDa-10 kDa.

Li et al. (2013), utilizaram proteases comerciais para hidrólise de caseína caprina e observaram que os peptídeos apresentaram sensibilidade maior ao teste de ABTS, em comparação aos teste com DPPH para a avaliação da atividade antioxidante. Chang et al. (2013), trabalharam com proteases de *Bifidobacterium longum* KACC 91563 e observaram que os peptídeos hidrolisados da caseína apresentaram uma maior atividade antioxidante com relação ao potencial de sequestro do radical ABTS após 24 horas de hidrólise.

#### **3.4.3. Atividade anti-hipertensiva**

A avaliação da atividade anti-hipertensiva apresentou resultados apenas para as frações de entre 3 kDa-10 kDa e < 3 kDa dos fungos *Mucor subtilissimus* URM 4133 e *Mucor guilliermondii* URM 5848 (Tabela 10.). Os peptídeos menores que 3 kDa demonstraram maior capacidade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), em comparação com a fração de peptídeos entre 3 kDa e 10 kDa. Norris et al. (2015), estudaram hidrolisados provenientes da degradação da caseína a partir de proteases digestivas e observaram atividade inibidora da ECA em frações de peptídeos de 3 kDa, o que demonstra o potencial de peptídeos de baixa massa molecular para inibir a ECA e está relacionado ao tamanho do sítio ativo.

#### 4. CONCLUSÃO

A hidrólise da caseína caprina por proteases sintetizadas por fungos filamentosos, demonstra grande potencial na liberação de peptídeos biologicamente ativos. As diferenças, principalmente nas atividades antimicrobiana e anti-hipertensiva, revelam que as proteases de diferentes espécies de micro-organismos são capazes de hidrolisar a caseína em diferentes regiões e liberar peptídeos com características e composições aminoacídicas distintas. A utilização de planejamentos estatísticos para maximizar a hidrólise da caseína, mostra que as interações e influências de diferentes variáveis são extremamente importantes e complexas. Além disso, este tipo de ferramenta é de fundamental importância na obtenção das condições ideais para hidrólise desta proteína.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, p. 1256-1262, 1979.
- AHMED, A. S.; EL-BASSIONY, T.; ELMALT, L. M.; IBRAHIM, H. R. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. **Food Research International**, v. 74, p. 80–88, 2015.
- ARRUDA, M. S.; SILVA, F. O.; EGITO, A. S.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F.; MOREIRA, K. A. New peptides obtained by hydrolysis of caseins from bovine milk by protease extracted from the latex *Jacaratia corumbensis*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, p. 73-79, 2012.
- ASOODEH, A.; YAZDI, M. M.; CHAMANI, J. Purification and characterisation of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from lysozyme hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 131, p. 291–295, 2012.

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUNO, M. A.; LAZZA, C. M.; ERRASTI, M. E.; LÓPEZ, L. M. I.; CAFFINI, N. O.; PARDO, M. F. Milk clotting and proteolytic activity of a enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 695–701, 2010.

CHANG, O. K.; SEOL, K. H.; JEONG, S. G.; OH, M. H.; PARK, B. Y.; PERRIN, C.; HAM, J. S. Casein hydrolysis by *Bifidobacterium longum* KACC 91563 and antioxidant activities of peptides derived there from. **Journal Dairy of Science**, v. 96, p. 1–12, 2013.

CHEISON, S. C.; ZHANG, S. B.; WANG, Z.; XU, S. Y. Comparison of a modified spectrophotometric and the pH-stat methods for determination of the degree of hydrolysis of whey proteins hydrolysed in a tangential-flow filter membrane reactor. **Food Research International**, v. 42, p. 91–97, 2009.

EGITO, A. S.; GIRARDET, J. M.; LAGUNA, L. E.; POIRSON, C.; MOLLÉ, D.; MICLO, L.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L. Milk – clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k- casein. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 816-825, 2007.

EGITO, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; LAGUNA, L. E.; MICLO, L.; GIRARDER, J. M.; GAILLARD, J. L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, p. 932-939, 2006.

ELZOGHBY, A. O.; EL-FOTOH, W. S. A.; ELGINDY, N. A. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 153, p. 206–216, 2011.

LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; KELLN, R. A. The Relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 76, p. 103-122, 1973.

LI, Z., JIANG, A.; YUE, T.; WANG, J.; SU, J. Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hidrolisates. **Jounal Dairy of Science**. v. 96, p. 4242-4251, 2013.

LIMA, C. A.; FILHO, J. L. L.; NETO, B. B.; CONVERTI, A.; CARNEIRO DA CUNHA, M. G.; PORTO. A. L. F. Production and characterization of a collagenolytic serine proteínase by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: A Factorial Study. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 549-560, 2011.

MINE, Y.; MA, F.; LAURIAU, S. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1088-1094, 2004.

NAIR, P. K.; ALEXANDER, M.; DALGLEISH, D.; CORREDIG, M. Physico-chemical properties of casein micelles in unheated skim milk concentrated by osmotic stressing: Interactions and changes in the composition of the serum phase. **Food Hydrocolloids**, v. 34, p. 46-53, 2014.

NORRIS, R.; O'KEEFFE, M. B.; POYARKOV, A.; FITZGERALD, R. J. Peptide identification and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity in prolylendoproteinase digests of bovine  $\alpha$ -casein. **Food Chemistry**, v. 188, p. 210–217, 2015.

OSMAN, A.; GODA, H. A.; ABDEL-HAMID, M.; BADRAN, S. M.; OTTE, J. Antibacterial peptides generated by Alcalase hydrolysis of goat whey. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 480-486, 2016.

PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; LIMA FILHO, J. L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 60, p. 115-122, 1996.

RANI, S.; POOJA, K.; PAL, G. K. Exploration of potential angiotensin converting enzyme inhibitory peptides generated from enzymatic hydrolysis of goat milk proteins. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 83–88, 2017.

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

RODRIGUÉZ-DÍAZ, J. C.; KUROZAWA, L. E.; NETTO, F. M.; HUBINGER, M. D. optimization of the enzymatic hydrolysis of blue shark skin. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 938-949, 2011.

SCHÄGGER, H.; JAGOW, G. V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p. 368-379, 1987.

SILVA, N. C.; SARMENTO, B.; PINTADO, M. The importance of antimicrobial peptides and their potential for therapeutic use in ophthalmology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, p. 5–10, 2013.

SMIALOWSKA, A.; MATIA-MERINO, L.; CARR, A. J. Assessing the iron chelation capacity of goat casein digest isolates. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 2553-2563, 2017.

SOUZA, P. M.; BITTENCOURT, M. L. A.; CAPARARA, C. C.; FREITAS, M.; ALMEIDA, R. P. C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FILHO, E. X. F.; PESSOA JUNIOR, A.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 337-346. 2015.

TAGLIAZUCCHI, D.; SHAMSIA, S.; HELAL, A.; CONTE, A. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from goats' milk released by *in vitro* gastro-intestinal digestion. **International Dairy Journal**, v. 71, p. 6-16, 2017.

TANG, W.; YUAN, H.; ZHANG, H.; WANG, L.; QIAN, H.; QI, X. An antimicrobial peptide screened from casein hydrolyzate by *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane affinity method. **Food Control**, v. 50, p. 413-422, 2015.

YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1277, p. 127–138, 2013.

## TABELAS

**Tabela 1** – Matriz do planejamento fatorial  $2^3$  para analisar os fatores de influência no grau de hidrólise (GH) da caseína caprina por proteases de diferentes fungos filamentosos URM.

Fatores	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
<b>Relação E/S</b>			
URM 6018	1:3	1:6	1:9
URM 6629	1:5	1:10	1:15
URM 5848	1:25	1:50	1:75
URM 4133	1:50	1:100	1:150
URM 4146	1:50	1:100	1:150
<b>Temperatura (°C)</b>	30	35	40
<b>Tempo (h)</b>	1	3	5

**Tabela 2** – Atividade proteolítica total ( $U.mL^{-1}$ ) e atividade específica ( $U.mg^{-1}$ ) de proteases produzidas por fungos filamentosos URM.

Fungo	Atividade Proteolítica ( $U.mL^{-1}$ )	Atividade Específica ( $U.mg^{-1}$ )
URM 4133	7,258±0,032	139,059±0,353
URM 4146	6,792±0,005	149,163±0,485
URM 5848	3,483±0,004	75,947±0,359
URM 6629	0,800±0,010	19,909±0,255
URM 6018	0,483±0,004	20,825±0,245
URM 4148	0,392±0,007	9,741±0,154
URM 6615	0,342±0,023	4,855±0,275
URM 4143	0,305±0,029	8,539±0,261
URM 5633	0,275±0,002	3,726±0,425
URM 5615	0,249±0,035	6,263±0,259
URM 6603	0,225±0,014	3,251±0,168
URM 6440	0,195±0,017	2,936±0,176

**Tabela 3** – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo *Penicillium decumbens* URM 6018 de acordo com o planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

<b>FV</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F-Valor</b>	<b>p-Valor</b>
(1)Relação E/S	167,9111	1	167,9111	52,2023	0,00546
(2)Tempo (h)	478,6331	1	478,6331	148,8035	0,00118
(3)Temperatura (°C)	5,3717	1	5,3717	1,6700	0,28679
1 by 2	69,5591	1	69,5591	21,6254	0,01875
1 by 3	24,6910	1	24,6910	7,6763	0,06953
2 by 3	0,2963	1	0,2963	0,0921	0,78134
Falta de Ajuste	56,2208	2	28,1104	8,7393	0,05607
Erro Puro	9,6496	3	3,2165		
Total SQ	812,3328	11			

FV = Fontes de Variação; SQ = Soma dos Quadrados; GL = Graus de Liberdade; QM= Quadrado Médio.

**Tabela 4** – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo *Aspergillus viride-nutans* URM 6629 de acordo com o planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

<b>FV</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F-Valor</b>	<b>p-Valor</b>
(1)Relação E/S	743,070	1	743,070	91,8199	0,00241
(2)Tempo (h)	1027,378	1	1027,378	126,9513	0,00149
(3)Temperatura (°C)	475,182	1	475,182	58,7174	0,00461
1 by 2	34,909	1	34,909	4,3136	0,12938
1 by 3	27,470	1	27,470	3,3944	0,16265
2 by 3	24,778	1	24,778	3,0618	0,17846
Falta de Ajuste	1,188	2	0,594	0,0734	0,93086
Erro Puro	24,278	3	8,093		
Total SQ	2358,253	11			

FV = Fontes de Variação; SQ = Soma dos Quadrados; GL = Graus de Liberdade; QM = Quadrado Médio.

**Tabela 5** – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848 de acordo com o planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

FV	SQ	GL	QM	F-Valor	p-Valor
(1)Relação E/S	1174,698	1	1174,698	226,5341	0,00063
(2)Tempo (h)	720,745	1	720,745	138,9917	0,00131
(3)Temperatura (°C)	107,682	1	107,682	20,7658	0,01980
1 by 2	174,806	1	174,806	33,7104	0,01016
1 by 3	47,132	1	47,132	9,0892	0,05699
2 by 3	8,292	1	8,292	1,5990	0,29534
Falta de Ajuste	10,808	2	5,404	1,0421	0,45326
Erro Puro	15,557	3	5,186		
Total SQ	2259,719	11			

FV = Fontes de Variação; SQ = Soma dos Quadrados; GL = Graus de Liberdade; QM = Quadrado Médio.

**Tabela 6** – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133 de acordo com o planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

FV	SQ	GL	QM	F-Valor	p-Valor
(1)Relação E/S	319,808	1	319,8076	26,7094	0,01405
(2)Tempo (h)	348,692	1	348,6917	29,1217	0,01247
(3)Temperatura (°C)	99,639	1	99,6386	8,32155	0,06328
1 by 2	239,015	1	239,0151	19,9619	0,02088
1 by 3	157,829	1	157,8287	13,1814	0,03597
2 by 3	79,717	1	79,7166	6,65771	0,08176
Falta de Ajuste	52,915	2	26,4577	2,20968	0,25711
Erro Puro	35,921	3	11,9736		
Total SQ	1333,534	11			

FV = Fontes de Variação; SQ = Soma dos Quadrados; GL = Graus de Liberdade; QM = Quadrado Médio.

**Tabela 7** – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo *Mucor* sp. URM 4146 de acordo com o planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

<b>FV</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F-Valor</b>	<b>p-Valor</b>
(1)Relação E/S	65,377	1	65,3771	5,82861	0,094655
(2)Tempo (h)	413,770	1	413,7697	36,88906	0,008960
(3)Temperatura (°C)	1,949	1	1,9485	0,17372	0,704857
1 by 2	21,732	1	21,7318	1,93747	0,258188
1 by 3	2,470	1	2,4695	0,22017	0,670908
2 by 3	2,254	1	2,2537	0,20093	0,684369
1*2*3	445,797	1	445,7967	39,74437	0,008064
Falta de Ajuste	641,511	1	641,5110	57,19301	0,004795
Erro Puro	33,650	3	11,2166		
Total SQ	1628,508	11			

FV = Fontes de Variação; SQ = Soma dos Quadrados; GL = Graus de Liberdade; QM = Quadrado Médio.

**Tabela 8** – Atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, das frações entre 3 kDa - 10 kDa e < 3 kDa de peptídeos. Concentração de 4 mg.mL<sup>-1</sup>. Os símbolos (+) e (-) indicam a presença ou ausência de inibição do crescimento microbiano, respectivamente.

Micro-organismos	Fração 3 kDa-10 kDa				
	URM 6018	URM 6629	URM 5848	URM 4133	URM 4146
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	+	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	-	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+

Micro-organismos	Fração < 3 kDa				
	URM 6018	URM 6629	URM 5848	URM 4133	URM 4146
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	+	-	+

**Tabela 9** – Atividade sequestradora dos radicais ABTS e DPPH em (%), das frações de peptídeos com massas moleculares entre 3 kDa-10 kDa e < 3 kDa, hidrolisadas a partir de caseína caprina (Relação E/S = -1, Temperatura = +1 e Tempo = +1). Concentração de 4 mg.mL<sup>-1</sup>.

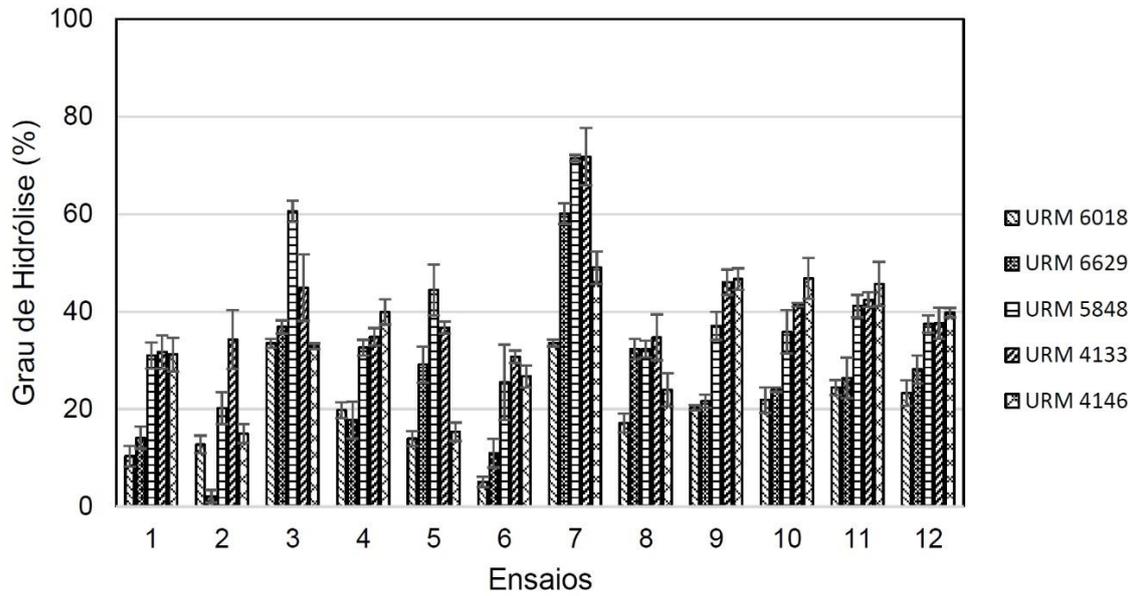
Fungo	3 kDa-10 kDa		< 3 kDa	
	ABTS (%)	DPPH (%)	ABTS (%)	DPPH (%)
URM 6018	99,42±0,14	25,63±0,95	77,38±0,84	19,27±0,98
URM 6629	99,66±0,22	21,43±0,26	82,14±0,68	16,81±0,39
URM 5848	100,00±0,00	32,21±0,28	89,67±0,22	16,98±0,55
URM 4133	99,18±0,08	29,52±0,35	73,52±0,17	14,19±0,43
URM 4146	99,37±0,06	29,23±0,76	89,86±0,37	15,72±0,85

**Tabela 10** – Atividade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) em %, a partir de hidrolisados da caseína caprina (Relação E/S = -1, Temperatura = +1 e Tempo = +1). Concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>.

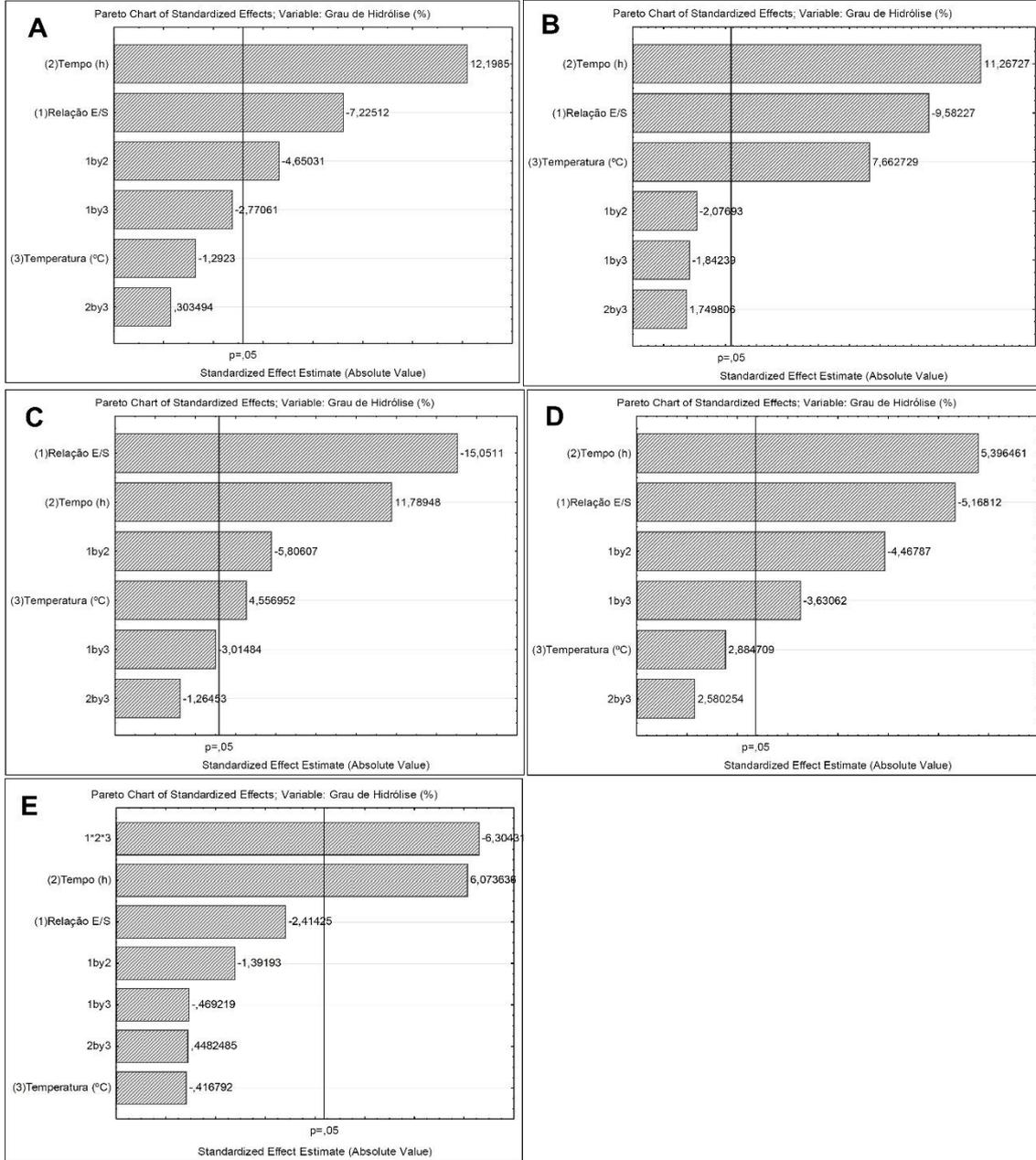
<b>Fungo</b>	<b>3 kDa-10 kDa</b>	<b>&lt; 3 kDa</b>
URM 6018	-	-
URM 6629	-	-
URM 5848	10,56±0,02	19,47±0,06
URM 4133	7,36±0,06	15,91±0,01
URM 4146	-	-

## FIGURAS

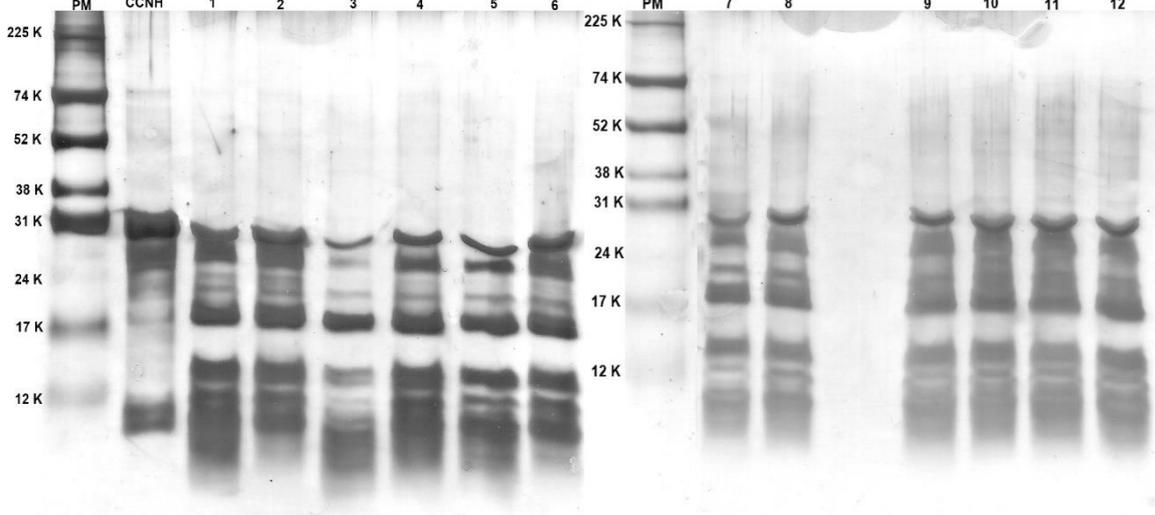
**Figura 1** – Grau de hidrólise da caseína caprina utilizando as proteases produzidas pelos fungos *Penicillium decumbens* URM 6018, *Aspergillus viride-nutans* URM 6629, *Mucor guilliermondii* URM 5848, *Mucor subtilissimus* URM 4133 e *Mucor sp.* URM 4146, no planejamento fatorial  $2^3$ .



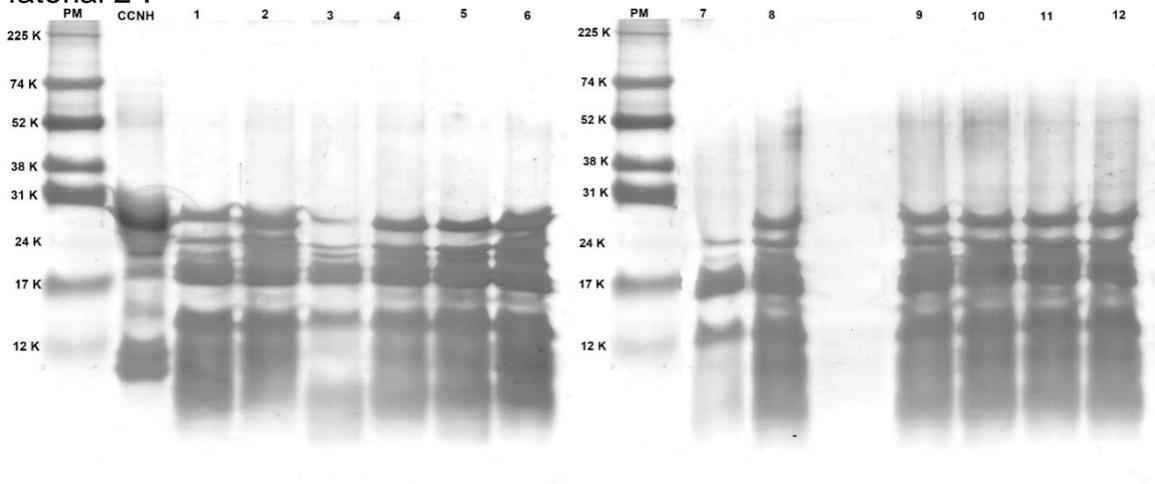
**Figura 2** – Gráficos de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis no GH da caseína caprina hidrolisada pelas proteases produzidas pelos fungos *Penicillium decumbens* URM 6018 (A), *Aspergillus viride-nutans* URM 6629 (B), *Mucor guilliermondii* URM 5848 (C), *Mucor subtilissimus* URM 4133 (D) e *Mucor sp.* URM 4146 (E) de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ .



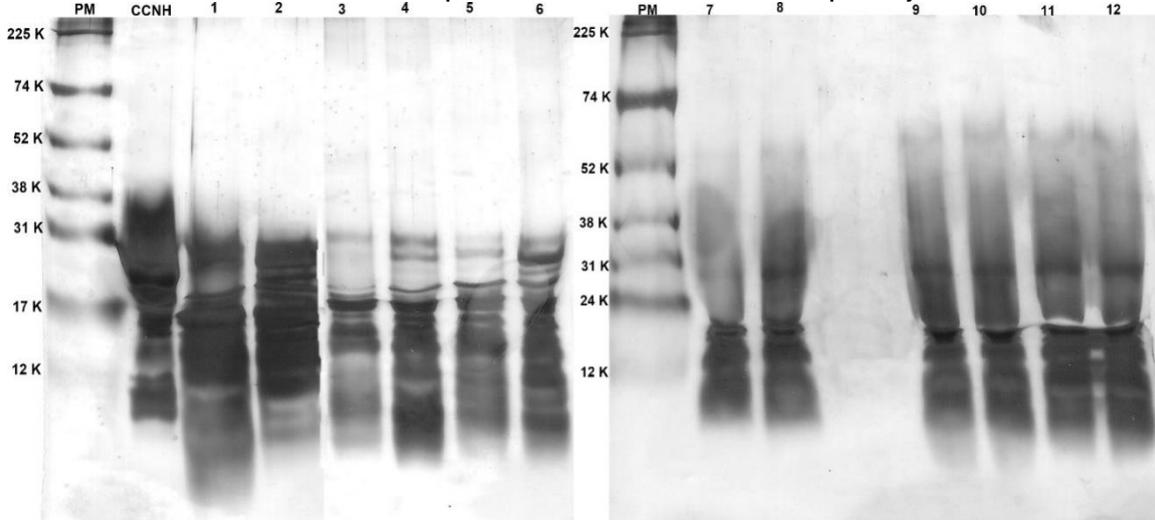
**Figura 3** – Gel de Tricina-SDS-PAGE 15,4% da caseína caprina, hidrolisada em função do tempo e da temperatura, ao pH 6,5, por protease do *Penicillium decumbens* URM 6018. Onde, PM (Padrão Molecular), CCNH (Caseína Caprina Não Hidrolisada), sendo os números 1-12 correspondentes aos ensaios do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.



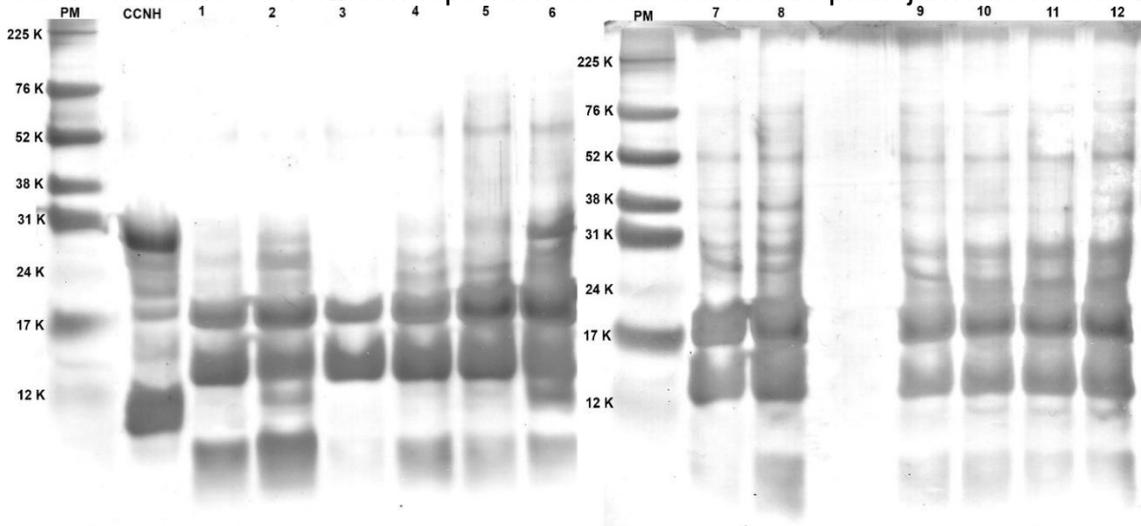
**Figura 4** – Gel de Tricina-SDS-PAGE 15,4% da caseína caprina, hidrolisada em função do tempo e da temperatura, ao pH 6,5, por protease do *Aspergillus viridenutans* URM 6629. Onde, PM (Padrão Molecular), CCNH (Caseína Caprina Não Hidrolisada), sendo os números 1-12 correspondentes aos ensaios do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.



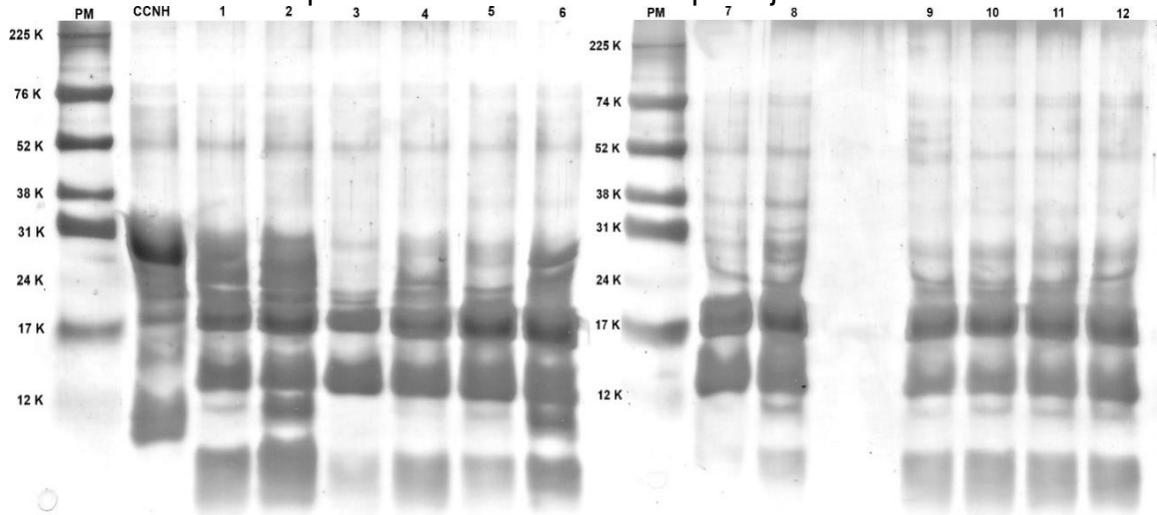
**Figura 5** – Gel de Tricina-SDS-PAGE 15,4% da caseína caprina, hidrolisada em função do tempo e da temperatura, ao pH 6,5, por protease do *Mucor guilliermondii* URM 5848. Onde, PM (Padrão Molecular), CCNH (Caseína Caprina Não Hidrolisada), sendo os números 1-12 correspondentes aos ensaios do planejamento fatorial  $2^3$ .



**Figura 6** – Gel de Tricina-SDS-PAGE 15,4% da caseína caprina, hidrolisada em função do tempo e da temperatura, ao pH 6,5, por protease do *Mucor subtilissimus* URM 4133. Onde, PM (Padrão Molecular), CCNH (Caseína Caprina Não Hidrolisada), sendo os números 1-12 correspondentes aos ensaios do planejamento fatorial  $2^3$ .



**Figura 7** – Gel de Tricina-SDS-PAGE 15,4% da caseína caprina, hidrolisada em função do tempo e da temperatura, ao pH 6,5, por protease do *Mucor sp.* URM 4146. Onde, PM (Padrão Molecular), CCONH (Caseína Caprina Não Hidrolisada), sendo os números 1-12 correspondentes aos ensaios do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.



### **CAPÍTULO III:**

**Purificação, caracterização bioquímica, parâmetros cinéticos e termodinâmicos de uma nova serina protease de *Mucor subtilissimus* URM 4133**

## **Purificação, caracterização bioquímica, parâmetros cinéticos e termodinâmicos de uma nova serina protease de *Mucor subtilissimus* URM 4133**

José Erick Galindo Gomes<sup>a</sup>, Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento<sup>b</sup>, Cristina Maria de Souza-Motta<sup>c</sup>, Eleni Gomes<sup>a</sup>, Maria Manuela Estevez Pintato<sup>d</sup>, Keila Aparecida Moreira<sup>b</sup>, Roberto da Silva<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE – UNESP – Rua Cristóvão Colombo 2265, São José do Rio Preto, São Paulo, CEP 15054-000, Brasil.

<sup>b</sup>Laboratório de Microbiologia, Tecnologia Enzimática e Bioprodutos – Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE - Avenida Bom Pastor, s/n.º, Garanhuns, Pernambuco, CEP 55292-270, Brasil

<sup>c</sup>Departamento de Micologia, Centro de Biociências – UFPE – Av. Prof. Nelson Chaves s/n, Recife, Pernambuco, CEP 50670–420, Brasil

<sup>d</sup>Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa/Porto, Rua Arquiteto Lobão Vital, Apartado 2511, 4200 Porto, Portugal.

\*Autor de correspondência: [dasilva@ibilce.unesp.br](mailto:dasilva@ibilce.unesp.br)

**Resumo:** Para o aumento da produção enzimática foi utilizado planejamento estatístico fatorial 2<sup>4</sup>. A atividade proteolítica variou entre 0,814 e 8,943 U.mL<sup>-1</sup>. A protease foi purificada em sistema FPLC e após análise por SDS-PAGE e zimografia, apresentou uma massa molecular de aproximadamente 30 kDa. A caracterização bioquímica da enzima revelou uma capacidade de desempenho da atividade catalítica em todas as faixas de pH testados, tanto ácidos, quanto alcalinos (acima de 80% de atividade residual). No entanto, a enzima se mostrou sensível a temperaturas mais elevadas com atividade residual de 51,2% após 24 horas aos 40 °C e foi desnaturada logo após uma hora em temperaturas acima de 60 °C. A protease não apresentou influências significativas de íons (mono ou bivalentes) nem de substâncias orgânicas, mas, foi completamente inibida pelo fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF), se tratando portanto de uma serina protease. Para os parâmetros cinéticos de hidrólise do substrato azocaseína a serina protease apresentou valor de  $K_m = 2,35$  mg azocaseína.mL<sup>-1</sup> e de  $V_{max} = 333,33$  U.mg proteína<sup>-1</sup>. Também foram avaliados parâmetros termodinâmicos de ativação como  $E_a$  e  $Q_{10}$  e de desnaturação térmica

irreversível como  $t_{1/2}$  e valor  $D$  além da entalpia ( $\Delta H$ ), entropia ( $\Delta S$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) para ambos os casos. Não foram encontradas sequências peptídicas compatíveis com esta enzima de *Mucor subtilissimus* URM 4133 após análise por MALDI-TOF, o que sugere se tratar de uma nova enzima.

**Palavras-chave:** fungo filamentoso, enzima proteolítica, desnaturação térmica

## 1. INTRODUÇÃO

Uma das principais áreas de pesquisa da biotecnologia atual está relacionada com a produção de enzimas. Estas moléculas são consideradas catalisadores biológicos que apresentam uma alta especificidade de reação com relação ao substrato. Sua atuação está associada também há fatores como, temperatura, pH e presença de íons metálicos. Como exemplo destas enzimas tem-se as proteases ou peptidases, responsáveis por catalisar a clivagem das ligações peptídicas de proteínas e em alguns casos, também podem apresentar atividade auto-proteolítica (MAGESWARI et al., 2017).

As serina proteases, correspondem à maior família de proteases existentes e estão envolvidas em diversos processos fisiológicos. Seu sítio catalítico apresenta resíduos de histidina, serina e ácido aspártico. Funcionalmente, participam de reações pós-transducionais das cadeias polipeptídicas e atuam em sua maioria, como endopeptidases na ativação de zimogênios, como é o caso da tripsina (PAGE; DICERA, 2008).

As proteases podem ser utilizadas em diferentes tipos de indústrias, para as mais variadas aplicações, como em produtos farmacêuticos, detergentes, processamento de alimentos, produção de lácteos, cerveja, couro, têxtil, biorremediação, entre outras. Dessa forma, as proteases são consideradas como as principais enzimas produzidas comercialmente no mundo. Cerca de dois terços destas enzimas, são produzidos por micro-organismos como fungos, bactérias e leveduras (DADSHAHI et al., 2016; FARHADIAN; ASOODEH; LAGZIAN, 2015).

A vantagem na utilização de micro-organismos como fonte de produção de proteases ocorre devido ao maior rendimento nos processos de purificação, em conjunto com uma diversidade de propriedades bioquímicas e catalíticas. Neste sentido, fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Mucor* são muito utilizados em diversos processos industriais em alimentos, principalmente no processamento de

derivados lácteos. Estes fungos são considerados como micro-organismos tecnológicos essenciais na obtenção de características específicas destes produtos, como, aspecto, textura e qualidades sensoriais (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; MORIN-SARDIN, et al., 2017).

O vasto uso de proteases por diferentes indústrias estimula as pesquisas para a busca destas enzimas com novas propriedades e, possibilita avanços significativos no processamento, preparação, armazenamento e aplicação dos produtos. Dentro deste cenário, a possibilidade de produção e aplicação de proteases em temperatura ambiente, sem que seja necessário o aumento dos custos de produção com energia, para gerar calor, é de extrema importância industrial (MAGESWARI et al., 2017).

Um dos principais aspectos que deve ser levado em consideração para a produção e comercialização de enzimas corresponde às etapas de purificação da molécula de interesse. Para a determinação da sequência de aminoácidos, ou de sua estrutura tridimensional, é necessário que a enzima esteja completamente pura. Além disso, para a aplicação de enzimas em diferentes processos industriais, é importante o conhecimento de parâmetros cinéticos e termodinâmicos, como  $V_{max}$ ,  $K_m$ ,  $K_{cat}$  e  $E_a$  (YADAV et al., 2015).

No presente estudo, são apresentados os processos de produção, purificação e caracterização bioquímica, bem como, os parâmetros cinéticos e termodinâmicos de uma nova serina protease extracelular, produzida pelo fungo filamentosso *Mucor subtilissimus* URM 4133.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Micro-organismo**

O fungo filamentosso *Mucor subtilissimus* URM 4133 foi disponibilizado pela Micoteca URM do Departamento de Micologia/Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco. Na literatura este micro-organismo é descrito como produtor de protease e não apresenta produção de micotoxinas. Este fungo foi mantido em tubo de ensaio que continha o meio de cultura ágar extrato de malte e repicado a cada trinta dias. O meio de cultura utilizado para esporulação foi o batata dextrose ágar (BDA).

### **2.2. Produção de protease**

Em frascos Erlenmeyers com capacidade para 125 mL, foi realizado planejamento fatorial completo  $2^4$  (Tabela 1) com o propósito de avaliar as melhores condições e os fatores que influenciam a produção de protease pelo fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133. O inóculo foi padronizado a  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>. A produção enzimática ocorreu em sistemas de fermentação submersa durante 96 horas. O extrato enzimático bruto foi obtido por meio de filtração em papel de filtro. A atividade proteolítica foi utilizada como variável resposta e analisada pelo programa Statistica 8.0. As diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) foram identificadas pelo método de Tukey com a utilização do software SPSS.

### **2.3. Atividade proteolítica e proteína total**

A atividade proteolítica foi realizada de acordo com o método descrito por Leighton et al. (1973), que utilizaram a azocaseína 1% (m/v), diluída em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2, como substrato. Para a reação, 60 µL do extrato enzimático foram adicionados a 100 µL de substrato e a mistura reacional foi incubada na ausência de luz durante 1 hora. Posteriormente, 480 µL de ácido tricloroacético 10% (m/v) foram adicionados e os ensaios centrifugados durante 5 minutos a 3000 x g e 4 °C. Logo após, 320 µL do sobrenadante foram misturados a 560 µL de hidróxido de sódio 1 M. A atividade enzimática foi definida como a variação de 0,01 da absorvância a 440 nm durante uma hora. As dosagens enzimáticas foram expressas em U.mL<sup>-1</sup>, e todos os ensaios realizados em triplicata.

Para determinar as proteínas totais das amostras foi utilizado o método descrito por Bradford (1976). Neste caso, 50 µL do extrato enzimático, foram adicionados a 1,5 mL do reagente de Bradford. A curva de calibração foi realizada com soro albumina bovina (BSA) como padrão, processada em uma gama de concentrações (10-1000 µg.mL<sup>-1</sup>). Estas soluções foram submetidas à leitura em espectrofotômetro a 595 nm. As dosagens de proteína foram expressas em mg.mL<sup>-1</sup> e todos os ensaios realizados em triplicata.

### **2.4. Eletroforese SDS-PAGE e Zimograma**

As análises de eletroforese SDS-PAGE tanto do extrato bruto, quanto das alíquotas da enzima purificada, foram realizadas de acordo com o método descrito por Laemmli, (1970). As amostras foram liofilizadas, concentradas 10 vezes e ressuspendidas em tampão (2X Laemmli Sample Buffer) da Bio-Rad Laboratories. O

gel de empilhamento foi composto por 3% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 e o gel de separação 10% em tampão Tris-HCl 0,37 M, pH 8,8. O padrão de massa molecular (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range) da Bio-Rad Laboratories foi composto por miosina (200 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116,25 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), albumina sérica (66,2 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa) e aprotinina (6,5 kDa). A corrida das amostras no gel foi realizada a 150 V durante 100 minutos. As bandas foram reveladas através do processo de coloração com nitrato de parata.

A atividade enzimática foi detectada por técnica de zimografia, segundo o método de Egito et al. (2007) em condições não desnaturantes. A eletroforese SDS-PAGE foi realizada mediante géis de poliacrilamida que continham 1% de caseína como substrato enzimático. Para esta finalidade, a amostra purificada também foi liofilizada, concentrada 10 vezes e ressuspendida em tampão (Zymogram Sample Buffer) da Bio-Rad Laboratories. Após a migração eletroforética o gel foi lavado com Triton X-100 2,5% por 30 min. a 4 °C. A reação de hidrólise foi realizada no interior do gel durante a incubação a 37 °C por 48 horas em um banho de Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5. Posteriormente, a detecção das proteases, ocorreu através da solução corante composta por 40% (v/v) de etanol, 10% (v/v) de ácido acético e 0,1% (m/v) de Coomassie Brilliant Blue (Sigma Aldrich), durante 60 minutos. Logo após, foi adicionado à solução descorante composta por 30% (v/v) de etanol e 7,5% (v/v) de ácido acético até o surgimento de bandas translúcidas.

## **2.5. Purificação da protease**

Para a purificação da enzima, utilizou-se o sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography - Äkta Purifier 900 GE Healthcare) e o processo foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa, foi acoplado ao sistema FPLC uma coluna HiTrap DEAE FF, 1mL (HiTrap IEX Selection Kit – GE Healthcare), e utilizado como eluente A o tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,5 e, como eluente B, o tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,5 com 1 M de NaCl. Este processo foi realizado com gradiente linear e fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. O extrato parcialmente purificado foi liofilizado e concentrado 2 vezes por ressuspensão em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,5, com 100 mM de glicina.

Para a segunda etapa de purificação, foi feito uso de uma coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) de exclusão molecular. Nesse caso, o tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,5 com 100 mM de glicina foi utilizado como único eluente com um fluxo de

0,5 mL.min<sup>-1</sup> e um fracionamento de 0,5 mL por microtubo. Posteriormente, foi realizada eletroforese SDS-PAGE, como descrito no item 2.4., com o objetivo de verificar o grau de pureza do processo.

## **2.6. Caracterização bioquímica da protease**

### **2.6.1. Temperatura e pH ótimos**

Para a realização dos ensaios de pH ótimo, o substrato reacional azocaseína foi diluído nos seguintes tampões: citrato – fosfato 0,2 M (pH: 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0); Tris – HCl 0,2 M (pH: 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0) e carbonato – bicarbonato 0,2 M (pH: 8,5; 9,0; 9,5; 10,0 e 10,5). A atividade proteolítica foi realizada para cada pH. Posteriormente, para o estudo da temperatura ótima da protease purificada, o substrato foi utilizado no pH ótimo obtido na análise anterior e a atividade proteolítica realizada em uma faixa de temperatura que variou entre 30 °C e 80 °C. As atividades enzimáticas foram expressas em atividade relativa (%).

### **2.6.2. Estabilidade à temperatura e ao pH**

Para verificar a estabilidade térmica da protease, a enzima purificada foi incubada nas temperaturas entre 30 °C e 70 °C. E para a estabilidade ao pH, a enzima foi diluída (1:1 v/v) nos mesmos tampões utilizados para o estudo do pH ótimo. Em ambos os casos a estabilidade da protease foi avaliada ao longo do tempo, portanto, foram aliqüotadas amostras no período de 0, 1, 2, 8 e 24 horas.

O monitoramento da atividade proteolítica, tanto para o estudo de estabilidade à temperatura, quanto para o estudo de estabilidade ao pH, foi avaliado incubando-se as alíquotas retiradas em seus respectivos tempos, nas condições de temperatura e pH ótimo obtidos anteriormente. As atividades enzimáticas foram expressas em atividade residual (%).

### **2.6.3. Efeito de íons metálicos, compostos orgânicos e inibidores na atividade proteásica**

Para avaliar a interferência dos íons metálicos sobre a atividade proteásica, foram utilizados sais nas concentrações finais de 1 mM e 5 mM, que continham os seguintes íons metálicos: K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Co<sup>2+</sup>. Com relação aos inibidores, substâncias específicas, conhecidas como inibidoras de protease, foram testadas. Deste modo, os seguintes inibidores específicos de

protease foram utilizados, nas concentrações finais de 0,5 e 1 mM: fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF), um inibidor de serina-proteases; ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA), que apresenta ação de inibição em metalo-proteases; pepstatina-A, com inibição para aspártico proteases e o inibidor E-64, utilizado na inibição de cisteíno-proteases.

Além disso, substâncias orgânicas como o dodecil sulfato de sódio (SDS) Triton X-100, Tween-20, Tween-80,  $\beta$ -mercaptoetanol e DMSO, foram utilizadas nas concentrações finais de 0,1% e 0,25% (m/v) e analisadas para verificar se causam interferência na atividade enzimática.

## 2.7. Determinação dos parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{max}$

Azocaseína (tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,5) foi utilizada como substrato, em uma gama de concentrações que variou de 1 – 20 mg.mL<sup>-1</sup>, para determinar os parâmetros cinéticos  $V_{max}$  e  $K_m$  da protease produzida por *Mucor subtilissimus* URM 4133. Os ensaios de atividade proteolítica foram realizados a 45 °C. Tanto a velocidade máxima ( $V_{max}$ ), quanto a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) foram obtidas por meio da equação de Lineweaver-Burk (equação 1), plotando-se um gráfico de regressão linear a partir das velocidades de reação nas diferentes concentrações de substrato.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1)$$

A constante catalítica ( $k_{cat}$ ), que representa quantas moléculas do substrato uma enzima consegue catalisar por segundo. E também é conhecida como *turnover number*, foi calculada de acordo com a equação 2. Além disso, a eficiência da enzima em converter o substrato, mesmo em baixas concentrações, em produto, foi representada de acordo com o quociente da divisão entre  $\frac{k_{cat}}{K_m}$ .

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]} \quad (2)$$

Onde  $[E]$ , é a concentração de enzima em mg.mL<sup>-1</sup>.

## 2.8. Energia de ativação e coeficiente de temperatura ( $Q_{10}$ )

Para a determinação da energia de ativação ( $E_a$ ), a enzima foi incubada com 1% (m/v) de azocaseína em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8.5 e a temperatura variou entre 30 – 45 °C. A lei de Arrhenius foi utilizada para considerar a dependência das constantes de velocidade com a temperatura, sendo  $E_a$  calculada a partir da inclinação do gráfico de  $\ln$  (atividade proteásica) *versus*  $1000/T$ . Onde,  $E_a = - \text{slope} \times R$ ,  $R$  corresponde a constante universal dos gases ( $8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) e  $T$  é a temperatura absoluta em Kelvin (K) (CASTRO et al., 2015).

O efeito da temperatura sobre a taxa de reação foi expresso em termos de coeficiente de temperatura ( $Q_{10}$ ), que corresponde à taxa de aumento da reação enzimática com o aumento da temperatura a cada 10 °C. Este coeficiente foi determinado pela equação 3, sugerida por Dixon e Webb (1979).

$$Q_{10} = \text{Antilog}E = (E_a \times 10/RT^2) \quad (3)$$

Onde  $E$  é igual a energia de ativação ( $E_a$ ).

## 2.9. Termodinâmica da reação enzimática

Os parâmetros termodinâmicos para a compreensão do comportamento reacional da protease antes do seu estado de desnaturação foram calculados segundo Javed et al., (2009) com a utilização da equação de taxa absoluta de Eyring (equação 4), derivada a partir da teoria do estado de transição (EYRING; STEARN, 1939).

$$k_{cat} = \left(\frac{k_b T}{h}\right) \times e^{\left(\frac{-\Delta H^*}{RT}\right)} \times e^{\left(\frac{\Delta S^*}{R}\right)} \quad (4)$$

Onde,  $k_b$  corresponde a constante de Boltzmann ( $1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ );  $T$  é equivalente a temperatura absoluta em Kelvin (K);  $h$  compreende a constante de Planck ( $6,626 \times 10^{-34} \text{ Js}$ );  $R$  é a constante universal dos gases ( $8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ );  $\Delta H^*$  é a entalpia de ativação e  $\Delta S^*$  a entropia de ativação.

Para os cálculos da entalpia de ativação ( $\Delta H^*$ ), entropia de ativação ( $\Delta S^*$ ) e energia livre de ativação de Gibbs ( $\Delta G^*$ ), do sistema de reação enzimática, foram utilizadas as seguintes equações:

$$\Delta H^* = E_a - RT \quad (5)$$

$$\Delta G^* = -RT \ln \left(\frac{k_{cat} h}{k_b \times T}\right) \quad (6)$$

$$\Delta S^* = \frac{(\Delta H^* - \Delta G^*)}{T} \quad (7)$$

Além disso, a energia livre de ligação com o substrato ( $\Delta G^*_{E-S}$ ) e da formação do estado de transição ( $\Delta G^*_{E-T}$ ), que indicam se a conversão espontânea do substrato em produto requer uma baixa energia ou não, foram calculadas através das seguintes derivações:

$$\Delta G^*_{E-S} = -RT \ln\left(\frac{1}{K_m}\right) \quad (8)$$

$$\Delta G^*_{E-T} = -RT \ln\left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right) \quad (9)$$

## 2.10. Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de inativação térmica

O estudo de inativação térmica da serina protease purificada do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133 foi realizado na ausência do substrato. A enzima foi incubada em tampão Tris-HCl (20 mM, pH 8,5) em várias temperaturas (40 °C a 60 °C) e as alíquotas retiradas nos tempos 0, 1, 2, 8 e 24 horas e imediatamente arrefecidas em banho de gelo durante 30 minutos. A atividade residual da amostra foi determinada com o substrato padrão (azocaseína) dentro das condições de pH e temperatura ótimos.

O valor da constante de velocidade de desativação ( $k_d$ ) foi expressa como um decaimento exponencial e encontrada plotando  $\ln(A/A_0)$  versus o tempo. A energia de desnaturação ( $E_d$ ) foi determinada pelo gráfico de Arrhenius, plotando  $\ln(k_d)$  em função de  $1000/T$  em Kelvin (ABDEL-NABY et al., 2017).

O tempo aparente de meia-vida da enzima, definida como o tempo em que a atividade residual atinge 50%, foi estimado pela relação de  $0,693/k_d$ . O tempo de redução decimal (valor  $D$ ), definido como o tempo requerido para a redução de 90% ou um-log 10 da atividade enzimática inicial em uma determinada temperatura, está relacionado com a constante de desativação ( $k_d$ ) e foi calculado como mostrado na equação 10:

$$D = 2,303/k_d \quad (10)$$

A termodinâmica de desnaturação enzimática foi determinada através do rearranjo da equação de taxa absoluta de Eyring, derivada da teoria do estado de transição, como mostrado na equação 11:

$$K_d = \left(\frac{k_b T}{h}\right) \times e^{\left(\frac{-\Delta H_d}{RT}\right)} \times e^{\left(\frac{\Delta S_d}{R}\right)} \quad (11)$$

Onde  $\Delta H_d$ ,  $\Delta G_d$  e  $\Delta S_d$  de desnaturação, foram calculados pela aplicação das equações 5, 6 e 7, com as modificações que na equação 5,  $E_d$  foi usado ao invés de  $E_a$ , assim como na equação 6,  $k_d$ , foi usado no lugar de  $k_{cat}$ .

### 2.11. Prospecção peptídica por espectrometria de massa (MALDI-TOF)

A análise da sequência peptídica da protease foi realizada por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF (4800 Plus, SCIEX). Para isto, a amostra foi preparada segundo a metodologia proposta por Osório e Reis (2013). A banda do gel que continha a enzima purificada foi submetida ao processo de digestão com tripsina. Posteriormente, a amostra foi enriquecida por cromatografia em C18 de fase reversa (ZipTips, Millipore) seguindo as instruções do fabricante e eluída na placa de MALDI com a solução de eluição do ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico da matriz MALDI a 8 mg.mL<sup>-1</sup> em 50% de acetonitrila (ACN), 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) e fosfato de amônio 6 mM. Os espectros de massa das sequências foram adquiridos em modo reflector positivo na faixa de massa de m/z 700-5000. Os picos com maior intensidade foram selecionados para o sequenciamento peptídico por MS/MS. As proteínas foram identificadas pela abordagem Peptide Mass Fingerprint + MS/MS com o software Mascot (v2.5.1, Matrix Science) usando o banco de dados da sequência de proteína UniProt para a seleção taxonômica Mucoromycota (versão 2017\_08). As configurações de pesquisa de proteínas foram a oxidação da metionina (modificação variável), zero clivagens perdidas e tolerância máxima de erro de 50 ppm (MS) e 0,5 Da (MS/MS). As pontuações de proteínas superiores a 67 foram consideradas significativas (p <0,05).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Produção de protease

Os resultados experimentais obtidos a partir da utilização de planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> (Tabela 2), mostraram que o ensaio 9 foi estatisticamente diferente

dos demais e apresentou a melhor combinação de variáveis para a produção de protease para o fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133, com valor máximo de atividade proteolítica de  $8,943 \pm 0,220$  U.mL<sup>-1</sup>. Este resultado foi maior que os encontrados por Yegin, Goksungur e Fernandez-Lahore (2012), que trabalharam com a produção de protease a partir de *Mucor mucedo* DSM 809, por meio de fermentação submersa em meio composto por caseína, glicose e uma solução de minerais com fosfato de potássio monobásico e atingiram uma produção de  $5,4 \pm 0,8$  U.mL<sup>-1</sup>. Já Merheb-Dini et al. (2010), trabalharam com a produção de uma protease coagulante a partir do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e obtiveram atividade proteolítica máxima de  $2,6 \pm 0,1$  U.mL<sup>-1</sup>.

A análise de variância mostrou que apenas a interação entre o farelo de trigo e o fosfato monobásico de potássio, não foi significativa (Tabela 3). O ajuste do modelo, medido pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), apresentou valor de 0,9997 e  $R^2_{ajuste} = 0,9993$ . Isso indica que 99,99% da variação total da produção de protease foi explicada pelo modelo estatístico e a falta de ajuste não foi significativa.

Uma menor temperatura no processo de fermentação foi determinante para o aumento da produção de proteases, conforme ilustrado na Figura 1. A variável apresentou um efeito extremamente negativo (-368,94) e foi o principal fator de influência na produção da enzima. Este comportamento pode ser explicado devido ao fato de que, em geral, as condições ótimas para o crescimento de espécies de fungos filamentosos do gênero *Mucor* spp. encontram-se em temperatura ambiente em torno de 25 °C (DANTIGNY; GUILMART; BENSOUSSAN, 2005). Além disso, Morin-Sardin et al. (2016), apresentaram resultados de temperatura ótima para crescimento de diversas espécies de *Mucor* entre 21,4 °C e 29,2 °C e temperatura máxima entre 25,8 °C e 40,9 °C.

Nascimento et al. (2015), trabalhando com planejamentos estatísticos para a otimização da produção de protease sintetizada por *Acremonium* sp. L1-4B, utilizaram como planejamento de primeira ordem um fatorial  $2^3$  e obtiveram resultados bastante dispares entre os ensaios, com atividades proteolíticas que variaram entre  $0,07 \pm 0,00$  U.mL<sup>-1</sup> e  $191,32 \pm 0,00$  U.mL<sup>-1</sup>. Isso mostra que um planejamento deste tipo, já resulta em influências significativas na produção da enzima, uma vez que possibilita a observação de quais variáveis apresentam influência direta sobre a síntese enzimática.

### 3.2. Purificação da protease

O perfil eletroforético por SDS-PAGE das proteínas presentes no extrato bruto do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133, revelou a presença de bandas densas com massa molecular que variou entre 10 kDa e 40 kDa aproximadamente (Figura 2A). Os procedimentos de purificação em sistema FPLC foram eficientes relacionados ao grau de pureza como pode ser observado nas Figura 2B e na Tabela 4. A técnica de zimografia também revelou que a protease do fungo URM 4133, apresenta massa molecular de aproximadamente, 30 kDa (Figura 2C).

A diversidade de enzimas proteolíticas presentes em extratos de origem fúngica estimula diretamente a busca de novas proteases a partir da utilização destes micro-organismos. Nascimento et al. (2016), trabalharam com o fungo *Mucor subtilissimus* UCP 1262 e relataram a produção de uma protease fibrinolítica com massa molecular de 97 kDa. Enquanto que, Yadav et al. (2015), trabalhando com o fungo *Aspergillus flavus* MTCC 9952, observaram a presença de uma serina protease com massa molecular de 38 kDa. Isto demonstra a variedade de enzimas proteolíticas que podem ser produzidas por diferentes espécies fúngicas.

### 3.3. Caracterização bioquímica da protease purificada

#### 3.3.1. Efeito do pH na atividade enzimática e estabilidade

O efeito do pH, utilizando sistema tampão na atividade da protease, sugere que, o intervalo de pH influenciou a atividade enzimática e não a composição do tampão. O maior valor de atividade relativa foi obtido em pH 8,5 ( $100\% \pm 0,00$ ) em tampão carbonato – bicarbonato. No entanto, pode-se observar na Figura 3A que a protease apresentou resultados satisfatórios ao longo de toda a faixa de pH, com menor atividade para pH 5,0 ( $61,56\% \pm 0,60$ ) em tampão citrato – fosfato.

Yegin, Goksungur e Fernandez-Lahore (2012), a partir do fungo *Mucor mucedo* DSM 809, obtiveram uma protease ácida, com pH ótimo de 5,0 e com inativação da protease no pH 7,0. Sethi et al. (2016), trabalharam com produção de protease a partir de *Aspergillus terreus* NCFT4269.10 e também observaram um pH ótimo de 5,0. Já Salihi, Asoodeh e Aliabadian (2017), com o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* CH93, detectaram a produção de uma protease alcalina com pH ótimo de 8,0. Desta forma, pode-se constatar que a protease produzida pelo micro-organismo do presente trabalho, apresenta bom desempenho para atividade proteolítica em largas faixas de pH, tanto ácidas, quanto alcalinas.

Com relação ao estudo de estabilidade ao pH, a protease foi estável em todos os tampões testados ao longo de toda a faixa de pH utilizada, mesmo após 24 horas de incubação (Figura 3B), permanecendo acima de 80% de atividade residual e com menor atividade registrada em pH 10,5 ( $81,88\% \pm 0,84$ ) tampão carbonato - bicarbonato. Desta forma, com relação ao pH, a biomolécula em questão possibilita a sua manipulação tanto em faixas ácidas, quanto alcalinas sem perda considerável de atividade proteolítica.

Fernandez-Lahore et al. (1999), apresentaram como melhores resultados para a estabilidade de uma protease sintetizada por *Mucor* sp. na faixa de pH entre 3,0 e 6,0. Shirasaka et al. (2012), a partir de protease produzida pelo *Aspergillus oryzae* KSK3A, observaram após 4 horas de incubação em uma faixa de pH entre 3,0 e 11,0, melhor atividade residual entre os pHs 5 e 9. As atividades permaneceram acima dos 40% e não houve desnaturação enzimática.

### 3.3.2. Efeito da temperatura na atividade enzimática e estabilidade

A protease purificada de *Mucor subtilissimus* URM 4133 foi ativa acima dos 50% na faixa de temperatura entre 30 °C – 55 °C, com máxima atividade aos 45 °C ( $100\% \pm 0,00$ ). Entretanto, pode-se observar na Figura 4A que temperaturas mais elevadas, superiores a 60 °C comprometem o desempenho da enzima, uma vez que há perda significativa de sua atividade, com mínimo de  $12,26\% \pm 0,73$  aos 80 °C.

Nascimento et. al (2016) trabalharam com uma protease com capacidade fibrinolítica produzida pelo *Mucor subtilissimus* UCP 1262 e observaram condições de temperatura ótima de 35 °C. Yadav et al. (2015), trabalharam com proteases sintetizadas por *Aspergillus flavus* MTCC 9952 e obtiveram temperatura ótima de atividade proteásica aos 40 °C. Já Merheb-Dini et al. (2010), com o *Thermomucor indiciae-seudaticae*, um fungo filamentoso termófilo, obtiveram a produção de uma protease com temperatura ótima um pouco mais elevada, de 65 °C.

O estudo de estabilidade térmica da protease purificada revelou que a maior atividade residual observada ocorreu aos 35 °C após 1 hora. Pode-se constatar na Figura 4B, que após o período de 24 horas de incubação, a protease apresentou 51,19% de atividade aos 40 °C. A enzima foi desnaturada aos 70 °C após 1 hora e aos 65 °C após 2 horas de incubação. Além disso, a partir de 50 °C as enzimas perderam atividade consideravelmente após 8 horas. Dessa forma, a enzima pode ser

considerada como termolábel, ou seja, que é inativada quando exposta a temperaturas mais elevadas.

Resultados semelhantes foram obtidos por Areces et al. (1992) para a protease do *Mucor bacilliformes*, uma espécie mesofílica, que apresentou atividade residual de 29% a 55 °C e de apenas 8% após 30 minutos de incubação a 60 °C. Nascimento et al. (2015), trabalharam com uma protease sintetizada por *Acremonium sp.* L1-4B e também observaram desnaturação enzimática após 3 horas de incubação a 50 °C. Assim como a protease encontrada por Mandujano-González et al. (2016), produzida por *Stenocarpella maydis*, a qual também foi desnaturada aos 50 °C logo após 1 hora.

### 3.3.3. Efeito de íons metálicos, compostos orgânicos e inibidores

Foi avaliado o efeito de várias substâncias sob a atividade da enzima purificada, dentre elas, vários íons metálicos nas concentrações de 1 mM e 5 mM, compostos orgânicos (0,10% e 0,25%), assim como inibidores específicos para proteases (0,5 mM e 1 mM), como apresentado na Tabela 5. A concentração de 5 mM dos íons  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e  $K^+$ , resultou em maior ativação da protease. Enquanto que, houve inibição acentuada da atividade para os íons  $Hg^{2+}$ ,  $Ag^+$ , e  $Co^{2+}$ , para a concentração de 5 mM. Resultados semelhantes foram encontrados por Yadav et al. (2015), que trabalharam com uma serina-protease alcalina produzida por *Aspergillus flavus* MTCC 9952 e também observaram ativação para íons dipositivos como  $Mn^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  na maior concentração e inibição da atividade proteolítica pelo mercúrio. Efeitos positivos para  $Mg^{2+}$  e  $K^+$  também foram encontrados por Farhadian, Asoodeh e Lagzian (2015), pela serina protease sintetizada por *Bacillus subtilis* DR8806, assim como inibição pelos íons  $Hg^{2+}$  e  $Co^{2+}$ .

Dentre os compostos orgânicos avaliados, o dodecil sulfato de sódio (SDS) foi responsável por inibição parcial da atividade apenas em sua maior concentração. Diferente do  $\beta$ -mercaptoetanol, uma substância com ação desnaturante de proteínas, que inibiu parcialmente a protease em ambas as concentrações avaliadas (0,10% e 0,25%). Os surfactantes Triton X-100, Tween-20 e Tween-80, assim como o solvente polar dimetilsulfóxido (DMSO), não apresentaram efeitos consideráveis na atividade residual da enzima. De forma semelhante, uma serina protease produzida pelo fungo *Myceliophthora sp.*, apresentou redução de 12% na atividade enzimática para o Triton X-100 e, redução de 80% na atividade proteolítica para o Tween-80, ambos surfactantes não-iônicos e foi desnaturada em SDS (ZANPHORLIN et al., 2011).

No estudo de inibidores enzimáticos de proteases pode-se observar que a enzima foi completamente inibida por fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF), um inibidor irreversível para serina proteases, o que confere uma visão primária sobre a natureza da enzima e do seu sítio ativo e leva a concluir que esta protease purificada, pertence a esta família de enzimas. São retratados na literatura, outros tipos de espécies de *Mucor* que secretam serina proteases, como a protease excretada pelo fungo *Mucor racemosus* (DI SANTO et al., 1992) e a protease fibrinolítica produzida pelo *Mucor subtilissimus* UCP 1262, utilizado por Nascimento et al. (2016).

### 3.4. Parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{max}$

Para a estimativa dos parâmetros cinéticos  $V_{max}$  e  $K_m$  da protease purificada do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133, os testes adicionais foram realizados à temperatura de 45 °C e pH 8,5 e a concentração do substrato variou entre 1-20 mg.mL<sup>-1</sup>. Os resultados foram plotados de acordo com o gráfico do duplo recíproco (Lineweaver-Burk) apresentado na Figura 5. A enzima mostrou seguir, com boa correlação ( $R^2 = 0,994$ ), a cinética do tipo Michaelis-Menten com valores de  $K_m = 2,35$  mg azocaseína.mL<sup>-1</sup> e  $V_{max} = 333,33$  U.mg proteína<sup>-1</sup>, como pode ser observado na Tabela 6. É difícil comparar estes resultados com os da literatura uma vez que, a atividade enzimática depende do tipo de substrato utilizado. Não há relatos destes parâmetros cinéticos para proteases de fungo do gênero *Mucor* com a utilização de azocaseína como substrato. No entanto, Castro et al. (2015) que avaliaram a aplicação de diferentes substratos para a produção de proteases por *Aspergillus niger*, obtiveram valores de  $K_m$  que variaram entre 0,44 e 1,92 mg azocaseína.mL<sup>-1</sup> e  $V_{max}$  entre 42,74 e 344,83 U.g<sup>-1</sup>.

### 3.5. Energia de ativação e coeficiente de temperatura ( $Q_{10}$ )

A energia de ativação ( $E_a$ ) da protease foi calculada com temperaturas entre 30 °C e 45 °C. O gráfico de Arrhenius (Figura 6) mostrou uma variação linear com o aumento da temperatura, o que sugere que a serina protease do *Mucor subtilissimus* URM 4133 possui uma conformação única até atingir a faixa de transição para a desnaturação. A  $E_a$  apresentou um valor positivo de 30,13 kJ.mol<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0,9988$ ), ou seja, as reações de catálise suprimem a desativação enzimática até o ponto de temperatura ótima. Esse resultado indica que a quantidade de energia necessária para que ocorra a formação do complexo enzimático de hidrólise da azocaseína, é

relativamente baixa, tornando sua capacidade hidrolítica eficaz. Hernández-Martínez et al. (2011) trabalharam com serina protease produzida por *Aspergillus fumigatus* e apresentaram valor de  $E_a = 62,0 \text{ kJ.mol}^{-1}$ . Já Souza et al. (2015), trabalharam com uma protease sintetizada pelo *Aspergillus foetidus* e observaram uma energia de ativação de  $19,03 \text{ kJ.mol}^{-1}$ .

O efeito da temperatura na taxa de reação da serina protease do *Mucor subtilissimus* URM 4133 apresentou valor de  $Q_{10} = 1,11$ , para a temperatura de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . O coeficiente de temperatura ( $Q_{10}$ ) é um parâmetro cinético utilizado para inferir se as reações catalíticas são controladas pela temperatura, ou por outros fatores. Geralmente, as reações enzimáticas mostram que o valor de  $Q_{10}$  varia entre 1 e 2. Um desvio destes valores indica um envolvimento de outros valores além da temperatura no controle da taxa de reação. Além disso, os valores de  $Q_{10}$  não parecem diferir significativamente entre as classes de enzimas, mesmo as termofílicas (ELIAS et al. 2014).

### 3.6. Termodinâmica da reação enzimática

Os parâmetros termodinâmicos de hidrólise do substrato (azocaseína) para serina protease purificada do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133 estão apresentados na Tabela 6. Resumidamente, a entalpia de ativação ( $\Delta H^*$ ) apresentou valor de  $27,53 \text{ kJ.mol}^{-1}$  e a entropia de ativação ( $\Delta S^*$ ) um valor negativo de  $-110,61 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ . Segundo Bhatti et al. (2007), a correlação entre uma baixa entalpia e um valor negativo para entropia, sugere a formação de um estado de transição eficiente e mais ordenado para o complexo enzima-substrato ( $ES^*$ ). Silva et al. (2017) trabalharam com uma protease do fungo *Aspergillus tamarisii* URM 4634 e obtiveram valores para o  $\Delta H^*$  de  $31,90 \text{ kJ.mol}^{-1}$  e  $13,90 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , nos extratos bruto e purificado, respectivamente. Já, Lima et al. (2011) estudaram a protease produzida por *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 e observaram valor para a entalpia de ativação de  $108 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , resultado muito elevado em comparação ao obtido no presente trabalho.

Segundo Riaz et al. (2007) a dimensão e viabilidade de uma reação enzimática é melhor avaliada através da mensuração da mudança na energia livre de ativação ( $\Delta G^*$ ) para a conversão de um complexo enzima-substrato em produto. Dessa forma, baixos valores de  $\Delta G^*$  indicam que a conversão do estado de transição do complexo enzima-substrato em produto foi mais espontânea. Sendo assim, os baixos valores

apresentados no presente trabalho (Tabela 6), tanto para a energia livre de transição ( $\Delta G^*_{E-T}$ ), quanto para a energia livre de ligação ( $\Delta G^*_{E-S}$ ), sugerem que a serina protease produzida por *Mucor subtilissimus* URM 4133 necessita de uma baixa quantidade de energia para a formação do complexo ativado (transição) e para a ligação do substrato ao estado de transição, conseqüentemente, apresenta uma boa eficiência de catálise devido a rápida estabilização do complexo  $ES^*$ .

### 3.7. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos de inativação térmica

Para a determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de inativação térmica irreversível da serina protease purificada, foram utilizados os dados obtidos durante o estudo de estabilidade térmica enzimática. Neste caso, o gráfico de Arrhenius (Figura 7) foi plotado entre as temperaturas de 40 °C e 60 °C. Como já é conhecido, o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) corresponde ao tempo necessário para que a atividade enzimática reduza 50% da sua atividade catalítica inicial quando submetida a uma determinada temperatura. Este parâmetro é muito importante para a utilização de uma enzima em nível industrial, uma vez que, quanto maior seu valor, maior é a termoestabilidade enzimática. Os resultados cinéticos apresentados na Tabela 7 mostram que o  $t_{1/2}$  diminuiu progressivamente, atrelado ao aumento da taxa específica de primeira-ordem da inativação térmica da protease ( $k_d$ ), com o aumento gradativo da temperatura, o que significa que a desnaturação irreversível é cada vez mais expressiva. No presente trabalho, o menor valor de  $k_d$  foi obtido para a temperatura de 40 °C (0,0297 h<sup>-1</sup>) e o maior valor aos 60 °C (0,7916 h<sup>-1</sup>), apresentando tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) de 23,34 e 0,88 horas, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Castro et al. (2015), através da protease produzida por *Aspergillus niger*, que apresentaram valores de  $t_{1/2} = 1386,29$  min, ou, 23,1 horas. Já, Hernández-Martínez et al. (2011), observaram um  $t_{1/2}$  de apenas 34 min. para a serina protease produzida por *Aspergillus fumigatus*. Portanto, a serina protease purificada no presente trabalho parece ser tão termoestável quanto, ou mais, que algumas proteases citadas na literatura.

O tempo de redução decimal (valor  $D$ ), definido como o tempo necessário para a redução de 90% na atividade enzimática inicial, corresponde a outro parâmetro que pode ser utilizado para averiguar a resistência da enzima à inativação térmica e fornecer informações essenciais para a utilização industrial. Pode ser observado na

Tabela 7 que na temperatura de 40 °C a enzima apresentou boa estabilidade, uma vez que, são necessárias 77,54 horas para reduzir sua atividade a 10% do valor inicial.

O gráfico de Arrhenius (Figura 8) de  $\ln(k_d)$  vs  $1/T$  permitiu estimar uma energia de ativação para a desnaturação térmica ( $E_d$ ) de 123,26 kJ.mol<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0,9844$ ). Este valor é superior aos encontrados por Silva et al. (2017) que apresentaram uma  $E_d = 49,7$  kJ.mol<sup>-1</sup> para a protease presente no estrato bruto produzido pelo fungo *Aspergillus tamaritii* URM 4634 e  $E_d = 28,8$  kJ.mol<sup>-1</sup> para a sua forma purificada. E por Lima et al. (2011) que obtiveram uma  $E_d = 107,4$  kJ.mol<sup>-1</sup> para uma protease colagenolítica produzida pelo fungo *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622. Isso indica uma maior termoestabilidade da serina protease purificada estudada no presente trabalho. Além disso, pode-se perceber a partir destas comparações, que a variabilidade dos dados de  $E_d$  é muito grande, provavelmente devido a grandes diferenças na fonte e na pureza das enzimas juntamente com os substratos utilizados.

Além disso, a estabilidade de uma proteína em determinada temperatura corresponde ao resultado do equilíbrio entre forças estabilizadoras e desestabilizadoras, que são influenciadas por interação hidrofóbicas e eletrostáticas, ligação de hidrogênio e de disulfeto e pelo grau de dobramento da molécula (ORTEGA et al., 2004). Dessa forma, a investigação de parâmetros termodinâmicos como entalpia ( $\Delta H$ ), entropia ( $\Delta S$ ) e energia livre ( $\Delta G$ ) da serina protease purificada do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133 foi realizada para entender o comportamento desta molécula em diferentes condições e os resultados estão apresentados na Tabela 7. O  $\Delta H$  é visto como uma medida do número de ligações não covalentes quebradas para a formação de um estado de transição para a inativação enzimática. Em geral, grandes valores de  $\Delta H$  estão associados a uma maior estabilidade da enzima (OLUSESAN et al., 2011; BATISTA et al., 2014). O  $\Delta H_d$  apresentou valor de 123,63 kJ.mol<sup>-1</sup> aos 40 °C e foi superior ao encontrado por Melikoglu, Lina e Webb (2013) para protease sintetizada pelo fungo *Aspergillus awamori* que apresentou um  $\Delta H_d = 80,4$  kJ.mol<sup>-1</sup> para a mesma temperatura. Já Souza et al. (2015), a partir de uma protease termofílica proveniente do *Aspergillus foetidus*, obtiveram valor de  $\Delta H_d = 311,39$  kJ.mol<sup>-1</sup> aos 55 °C. Isto comprova que, quanto maior o  $\Delta H$ , maior a estabilidade térmica da enzima.

A extensão do processo de desnaturação térmica da enzima também depende da entropia de desnaturação ( $\Delta S_d$ ) que expressa a quantidade de energia por grau envolvida na transição de um estado nativo para um estado desnaturado. O  $\Delta S$

representa a variação na extensão da desordem local entre estado de transição e estado fundamental. Assim, um  $\Delta S$  mais elevado implica um aumento no número de moléculas de proteína no estado ativo de transição e um aumento na desordem que pode ser do sítio ativo da enzima ou da sua estrutura, o que equilibra a principal força motriz no processo de desnaturação por calor (MARANGONI, 2003; SINGH; CHHATPAR, 2011; MELIKOGLU; LINA; WEBB, 2013). Os valores de  $\Delta S_d$  foram positivos em todas as temperaturas as quais a serina protease do *Mucor subtilissimus* URM 4133 foi testada e variou entre 120,24 kJ.mol<sup>-1</sup> e 124,82 kJ.mol<sup>-1</sup>. Isto sugere um maior estado de desordem no processo de transição. Valores positivos de  $\Delta S_d$  também foram apresentados por Castro et al., (2015) para a protease de *Aspergillus niger* ( $222,47 \leq \Delta S_d \leq 227,58$  J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>) e por Souza et al. (2015) para a protease secretada por *Aspergillus foetidus* ( $599,59 \leq \Delta S_d \leq 610,49$  J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>). Olusesan et al. (2011) indicam que, valores positivos para o  $\Delta S_d$  são encontrados se a taxa limitante da reação for o desdobramento da proteína, com resultados moderadamente altos para o  $\Delta H$  e menores para o  $\Delta G$ , o que está de acordo com o presente trabalho.

A energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) é outro importante parâmetro termodinâmico e inclui ambas as contribuições relatadas anteriormente (entalpia e entropia). Desta forma, pode ser considerada como uma ferramenta mais precisa e confiável para avaliar a estabilidade de uma enzima. Quanto menor ou negativo for o seu valor mais espontâneo é o processo, ou seja, a enzima se torna menos estável e a desnaturação ocorre mais facilmente, sendo o inverso, verdadeiro (MARANGONI, 2003; GOHEL; SINGH, 2012). De forma consistente com os demais parâmetros já discutidos anteriormente, a serina protease purificada a partir de *Mucor subtilissimus* URM 4133 apresentou valores positivos para a  $\Delta G_d$  (Tabela 7), que variaram entre 82,54 e 85,97 kJ.mol<sup>-1</sup> na faixa de temperatura estudada. Valores semelhantes foram obtidos por Silva et al. (2017) para a protease purificada proveniente de *Aspergillus tamarii* URM 4634 ( $91,8 \leq \Delta G_d \leq 98,0$  kJ.mol<sup>-1</sup>) e por Hernández-Martínez et al. (2011) para a serina protease purificada do *Aspergillus fumigatus* ( $89,2 \leq \Delta G_d \leq 91,4$ ).

### **3.8. Prospecção peptídica por espectrometria de massa (MALDI-TOF)**

A ferramenta utilizada para tentar identificar a serina protease purificada produzida pelo fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133 foi baseada na técnica de “peptide mass fingerprinting (PMF)” com espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF. A massa dos peptídeos digeridos com tripsina foi determinada e

pesquisada em bancos de dados no “National Center for Biotechnology Information – NCBI”, mais especificamente no “The Universal Protein Resource (UniProt)”, não sendo combinadas com quaisquer proteases presentes neste banco de dados (Figura 9A). No entanto, a sequência obtida foi combinada com muitas proteínas hipotéticas e não caracterizadas de fungos da divisão Mucoromycota (Figura 9B), como por exemplo, uma proteína não caracterizada de *Rhizopus delemar* (Nº de acesso: I1CSQ0, Massa: 167476, Score: 59, Matches: 66), outra proteína não caracterizada de *Lichtheimia ramosa* (Nº de acesso: A0A077X1Z2, Massa: 170271, Score: 57, Matches: 64) e um fragmento de uma proteína de choque térmico do fungo *Rhizopus stolonifer* (Nº de acesso: Q8J1X9, Massa: 55014, Score: 54, Matches: 28). Além disso, a massa de peptídeos derivada da serina protease do *Mucor subtilissimus* URM 4133 também foi combinada com outras proteínas não caracterizadas de fungos da mesma espécie e com massa molecular semelhante ao encontrado no presente trabalho, como é o caso de uma proteína não caracterizada de *Mucor circinelloides* (Nº de acesso: S2JX18, Massa: 30010, Score: 50, Matches: 18). Esse resultado sugere que a serina protease purificada obtida no presente trabalho pode se tratar de uma nova serina protease.

#### 4. CONCLUSÃO

A utilização de planejamento estatístico fatorial  $2^4$  para aumentar a produção da protease do fungo filamentosso *Mucor subtilissimus* URM 4133 se mostra uma ferramenta eficiente. A utilização de sistema FPLC é eficiente para a obtenção de um alto grau de pureza para a protease. A enzima é classificada como uma serina protease pela inibição da sua atividade proteolítica após a exposição do seu sítio catalítico ao inibidor fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) específico de serina proteases. Esta enzima apresenta estabilidade térmica a temperaturas máximas de até 40°C durante 24 horas, porém não há grandes influências na atividade para íons e substâncias orgânicas estudadas no presente trabalho. Os parâmetros cinéticos mostram que esta serina protease apresenta boa eficiência em catalisar o substrato azocaseína e a termodinâmica revela que a enzima pode ser utilizada em nível industrial em temperaturas medianas. A partir dos resultados obtidos na análise de MALDI-TOF pode-se sugerir que esta serina protease pode ser uma enzima nova ainda não catalogada nos bancos de dados específicos.

## 5. REFERÊNCIAS

- ABDEL-NABY, M. A.; AHMED, S. A.; WEHAIDY, H. R.; EL-MAHDY, S. A. Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of stabilized *Bacillus stearotherophilus* alkaline protease. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 265–271, 2017.
- ARECES, L. B.; BONINO, M. B. J.; PARRY, M. A. A.; FRAILE, E. R.; FERNÁNDEZ, H. M.; CASCONO, O. Purification and characterization of a milk clotting protease from *Mucor bacilliformis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 37, p. 283-294, 1992.
- BATISTA, K. A.; BATISTA, G. L. A.; ALVES, G. L.; FERNANDES, K. F. Extraction, partial purification and characterization of polyphenoloxidase from *Solanum lycocarpum* fruits. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 102, p. 211–217, 2014.
- BHATTI, H. N.; RASHID, M. H.; ASGHER, M.; NAWAR, R.; KHALID, A. M.; PERVEEN, R. Chemical modification results in hyperactivation and thermostabilization of *Fusarium solani* glucoamylase. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 177-185, 2007.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CASTRO, H. C.; ABREU, P. A.; GERALDO, R. B.; MARTINS, R. C. A.; SANTOS, R.; LOUREIRO, N. I. V.; CABRAL, L. M.; RODRIGUES, C. R. Looking at the proteases from a simple perspective. **Journal of Molecular Recognition**, v. 24, p. 165-181, 2011.
- CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; ALBERNAZ, J. R. M.; SOARES, M. H.; SATO, H. H. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 199–207, 2015.
- DADSHAHI, Z.; HOMAEI, A.; ZEINALI, F.; SAJEDI, R. H.; KHAJEH, K. Extraction and purification of a highly thermostable alkaline caseinolytic protease from wastes *Penaeus vannamei* suitable for food and detergent industries. **Food Chemistry**, v. 202, p. 110–115, 2016.
- DANTIGNY, P.; GUILMART, A.; BENSOUSSAN, M. Basis of predictive mycology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, p. 187– 196, 2005.
- DI SANTO, M. E.; LI, Q.; LOGAN, D. Purification and characterization of a developmentally regulated carboxypeptidase from *Mucor racemosus*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 447-455, 1992.
- DIXON, M.; WEBB, E. C. Enzyme Kinetics, third ed. Academic Press, New York, 1979.
- EGITO, A. S.; GIRARDET, J. M.; LAGUNA, L. E.; POIRSON, C.; MOLLÉ, D.; MICLO, L.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L. Milk – clotting activity of enzyme extracts from

sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k- casein. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 816-825, 2007.

ELIAS, M.; WIECZOREK, G.; ROSENNE, S.; TAWFIK, D. S. The universality of enzymatic rate–temperature dependency. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, p. 1–7, 2014.

EYRING, H.; STEARN, A. E. The application of the theory of absolute reaction rates to proteins. **Chemical Reviews**, v. 24, p. 253–270, 1939.

FARHADIAN, S.; ASOODEH, A.; LAGZIAN, M. Purification, biochemical characterization and structural modeling of a potential htrA-like serine protease from *Bacillus subtilis* DR8806. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 15, p. 51–58, 2015.

FERNANDEZ-LAHORE, H. M.; AUDAY, R. M.; BONINO, M. B. J.; PIRPIGNANI, L.; MACHALINSKI, C.; CASCONI, O. Purification and characterization of an acid protease from mesophilic *Mucor* sp. solid-state cultures. **Journal of Peptide Research**, v. 53, p. 599-605, 1999.

GOHEL, S. D.; SINGH, S. P. Purification strategies, characteristics and thermodynamic analysis of a highly thermostable alkaline protease from salt-tolerant alkaliphilic actinomycete, *Nocardioopsis alba* OK-5. **Journal of Chromatography B**, v. 889–890, p. 61–68, 2012.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; BERGMANN, C. W.; LOERA-CORRAL, O.; ROJO-DOMÍGUEZ, A.; HUERTA-OCHOA, S.; REGALADO GONZÁLEZ, C.; PARADO-BARRAGÁN, L. A. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2001–2006, 2011.

JAVED, M. R.; RASHID, M. H.; NADEEM, H.; RIAZ, M.; PERVEEN, R. Catalytic and thermodynamic characterization of endoglucanase (CMCase) from *Aspergillus oryzae* cmc-1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, p. 483-497, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; KELLN, R. A. The Relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 76, p. 103-122, 1973.

LIMA, C. A.; LIMA FILHO, J. L.; NETO, B. B.; CONVERTI, A.; CUNHA, M. G. C.; PORTO, A. L. F. Production and characterization of a collagenolytic serine protease by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: A factorial study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 16, p. 549-560, 2011.

MAGESWARI, A.; SUBRAMANIAN, P.; CHANDRASEKARAN, S.; KARTHYKEIAN, S.; GOTHANDAM, K. M. Systematic functional analysis and application of a cold-active serine protease from a novel *Chryseobacterium* sp. **Food Chemistry**, v. 217, p. 18–27, 2017.

MANDUJANO-GONZÁLEZ, V.; TÉLLEZ-JURADO, A.; ANDUCHO-REYES, M. A.; ARANA-CUENCA, A.; MERCADO-FLORES, Y. Purification and characterization of the extracellular aspartyl protease APSm1 from the phytopathogen fungus *Stenocarpella maydis*. **Protein Expression and Purification**, v. 117, p. 1-5, 2016.

MARANGONI, A. G. Enzyme Kinetics: A Modern Approach, John Wiley & Sons, 2003. MELIKOGLU, M.; LINA, C. S. K.; WEBB, C. Kinetic studies on the multi-enzyme solution produced via solid state fermentation of waste bread by *Aspergillus awamori*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 80, p. 76–82, 2013.

MERHEB-DINI, C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; DA SILVA, R. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucorindicae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucorindicae-seudaticae*N31). **Food Chemistry**, v. 120, p. 87–93, 2010.

MORIN-SARDIN, S.; JANY, J. L.; ARTIGAUD, S.; PICHEREAU, V.; BERNAY, B.; COTON, E.; MADEC, S. Proteomic analysis of the adaptative response of *Mucor* spp. to cheese environment. **Journal of Proteomics**, v. 154, p. 30–39, 2017.

MORIN-SARDIN, S.; RIGALMA, K.; COROLLER, L.; JANY, J. L.; COTON, E. Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. **Food Microbiology**, v. 56, p. 69-79, 2016.

NASCIMENTO, T. C. E. S.; SENA, A. R.; GOMES, J. E. G.; SANTOS, W. L.; MONTALVO, G. S. A.; TAMBOURGI, E. B.; MEDEIROS, E. V.; SETTE, L. D.; PESSOA JUNIOR, A.; MOREIRA, K. A. Extracellular serine proteases by *Acremonium* sp. L1-4B isolated from Antarctica: Overproduction using cactuspear extract with response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 737–744, 2015.

NASCIMENTO, T. P.; SALES, A. E.; PORTO, C. S.; BRANDÃO, R. M. P.; CAMPOSTAKAKI, G. M.; TEIXEIRA, J. A. C.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F.; CONVERTI, A. Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). **Journal of Chromatography B**, v. 1025, p. 16–24, 2016.

OLUSESAN, A. T.; AZURA, L. K.; FORGHANI, B.; BAKAR, F. A.; MOHAMED, A. K. S.; RADU, S.; MANAP, M. Y. A.; SAARI, N. Purification, characterization and thermal inactivation kinetics of a non-regioselective thermostable lipase from a genotypically identified extremophilic *Bacillus subtilis* NS 8. **New Biotechnology**, v. 28, p. 738–745, 2011.

ORTEGA, N.; DIEGO, S.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M. D. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chemistry**, v. 88, p. 209–217, 2004.

OSÓRIO, H.; REIS, C. A. Mass Spectrometry methods for studying glycosylation in cancer. Rune Matthiesen (ed.), *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics, Methods in Molecular Biology*, v. 1007, p. 301-316, 2013.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: Classification, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, p. 1220-1236, 2008.

RIAZ, M.; PERVEEN, R.; JAVED, M. R.; NADEEN, H.; RASHID, M. H. Kinetic and thermodynamic properties of novel glucoamylase from *Humicola* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, p. 558–564, 2007.

SALIHI, A.; ASOODEH A.; ALIABADIAN, M. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 94, p. 827-835, 2017.

SETHI, B. K.; JANA, A.; NANDA, P. K.; DAS MOHAPATRA, P. K.; SAHOO, S. L. Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using chickling vetch peels. *Journal of Taibah University for Science*, v. 10, p. 571-583, 2016.

SHIRASAKA, N.; NAITOU, M.; OKAMURA, K.; KUSUDA, M.; FUKUTA, Y.; TERASHITA, T. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK3. *Mycoscience*, v. 53, p. 354–364, 2012.

SILVA, O. S.; OLIVEIRA, R. L.; SILVA, J. C.; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Thermodynamic investigation of an alkaline protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: A comparative approach between crude extract and purified enzyme. *International Journal of Biological Macromolecules (ARTICLE IN PRESS) xxx (2017) xxx–xxx*.

SINGH, A. K.; CHHATPAR, H. S. Purification, characterization and thermodynamics of antifungal protease from *Streptomyces* sp. A6. *Journal of Basic Microbiology*, v. 51, p. 424–432, 2011.

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

YADAV, S. K.; BISHT, D.; TIWARI, S.; DORMWAL, N. S. Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 4, p. 667–677, 2015.

YEGIN, S.; GOKSUNGUR, Y.; FERNANDEZ-LAHORE, M. Purification, structural characterization, and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged cultures of *Mucor mucedo* DSM 809. *Food Chemistry*, v. 133, p. 1312–1319, 2012.

ZANPHORLIN, L. M.; CABRAL, H.; ARANTES, E.; ASSIS, D.; JULIANO, L.; DA-SILVA, R.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2137–2143, 2011.

## TABELAS

**Tabela 1** – Matriz do planejamento fatorial completo  $2^4$  para analisar os fatores de influência na produção de protease pelos fungos *Mucor subtilissimus* URM 4133.

Fatores	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Temperatura °C	35	40	45
Farelo de trigo (g)	0,25	0,375	0,50
Farelo de soja (g)	0,20	0,30	0,40
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g)	0,10	0,15	0,20

**Tabela 2** – Matriz do planejamento fatorial fracionado  $2^4$ , contendo quatro pontos centrais associados com a variável resposta atividade proteásica total do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133.

Ensaio	Temperatura (°C)	F. Trigo (g)	F. Soja (g)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g)	U.mL <sup>-1</sup>
1	35	0,25	0,2	0,1	7,687 <sup>c</sup> ±0,165
2	45	0,25	0,2	0,1	1,173 <sup>i</sup> ±0,058
3	35	0,5	0,2	0,1	6,822 <sup>d</sup> ±0,057
4	45	0,5	0,2	0,1	0,913 <sup>ijk</sup> ±0,032
5	35	0,25	0,4	0,1	4,978 <sup>f</sup> ±0,023
6	45	0,25	0,4	0,1	0,814 <sup>k</sup> ±0,070
7	35	0,5	0,4	0,1	4,589 <sup>g</sup> ±0,251
8	45	0,5	0,4	0,1	0,826 <sup>ik</sup> ±0,015
<b>9</b>	<b>35</b>	<b>0,25</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>8,943<sup>a</sup>±0,220</b>
10	45	0,25	0,2	0,2	1,112 <sup>ij</sup> ±0,021
11	35	0,5	0,2	0,2	8,173 <sup>b</sup> ±0,032
12	45	0,5	0,2	0,2	0,856 <sup>ik</sup> ±0,035
13	35	0,25	0,4	0,2	6,871 <sup>d</sup> ±0,071
14	45	0,25	0,4	0,2	1,077 <sup>ijk</sup> ±0,045
15	35	0,5	0,4	0,2	6,365 <sup>e</sup> ±0,112
16	45	0,5	0,4	0,2	0,923 <sup>ijk</sup> ±0,035
17	40	0,375	0,3	0,15	3,905 <sup>h</sup> ±0,017
18	40	0,375	0,3	0,15	3,960 <sup>h</sup> ±0,017
19	40	0,375	0,3	0,15	3,963 <sup>h</sup> ±0,033
20	40	0,375	0,3	0,15	3,912 <sup>h</sup> ±0,015

**Tabela 3** – Análise de variância (ANOVA), para verificar a influências dos parâmetros utilizados no planejamento fatorial fracionado 2<sup>4</sup> sob a produção de protease pelo fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133.

FV	SQ	GL	QM	F-valor	p-valor
(1)Temperatura (°C)	136,6041	1	136,6041	136116,4	0,000000
(2)F.T.	0,6373	1	0,6373	635,1	0,000137
(3)F.S.	5,3335	1	5,3335	5314,5	0,000006
(4)KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,6533	1	2,6533	2643,8	0,000016
1 by 2	0,2167	1	0,2167	216,0	0,000683
1 by 3	4,4287	1	4,4287	4412,9	0,000008
1 by 4	2,2885	1	2,2885	2280,3	0,000020
2 by 3	0,0762	1	0,0762	76,0	0,003179
2 by 4	0,0026	1	0,0026	2,6	0,205062
3 by 4	0,1547	1	0,1547	154,2	0,001126
Falta de Ajuste	0,0486	6	0,0081	8,1	0,057418
Erro Puro	0,0030	3	0,0010		
Total SQ	152,4474	19			

FV = Fontes de Variação; SQ = Soma dos Quadrados; GL = Graus de Liberdade; QM = Quadrado Médio. F.T. = Farelo de trigo; F.S. = Farelo de soja

**Tabela 4** – Etapas de purificação para a protease do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133.

URM 4133	U.mL <sup>-1</sup>	mg.mL <sup>-1</sup>	U.mg <sup>-1</sup>	mL	R. (%)	F. P.
Extrato Bruto	4,95	0,628	7,88	1,0	100	1
DEAE FF	4,85	0,404	12,00	1,0	98	2
DEAE FF [2X]	8,92	0,695	12,83	1,0		
Exclusão Molecular	5,56	0,020	278,00	1,0	62	22

U.mL<sup>-1</sup> = Atividade Proteásica Total; mg.mL<sup>-1</sup> = Proteína Total; U.mg<sup>-1</sup> = Atividade Específica; mL = Volume; R = Rendimento e F.P. = Fator de Purificação.

**Tabela 5** – Efeito de íons metálicos, compostos orgânicos e inibidores na atividade da protease purificada produzida por *Mucor subtilissimus* URM 4133.

Íons Metálicos	Atividade Residual (%)	
	1 mM	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	109,32±1,21	100,93±2,18
MnCl <sub>2</sub>	124,35±2,91	128,45±1,78
MgCl <sub>2</sub>	105,80±1,54	114,30±0,67
FeCl <sub>3</sub>	105,28±1,93	93,89±0,91
CdCl <sub>2</sub>	106,84±1,97	104,14±1,28
HgCl <sub>2</sub>	93,06±2,20	38,76±0,87
AgNO <sub>3</sub>	86,63±0,72	28,60±1,87
CuCl <sub>2</sub>	98,55±2,17	79,59±2,43
CoCl <sub>2</sub>	61,14±0,43	60,62±0,69
KCl <sub>2</sub>	111,40±2,11	112,64±1,65
<b>Compostos Orgânicos</b>		
	Atividade Residual (%)	
	0,10% (m/v)	0,25% (m/v)
Triton X-100	93,16±2,11	91,60±2,07
Tween-20	104,04±1,92	94,92±1,20
Tween-80	100,62±2,66	99,17±2,17
DMSO	106,42±3,33	103,83±1,43
SDS	101,11±1,93	68,19±1,96
β-Mercaptoetanol	65,91±0,73	68,39±2,04
<b>Inibidores</b>		
	Atividade Residual (%)	
	0,5 mM	1 mM
EDTA	101,55±2,55	101,97±0,95
Pespstatina-A	89,57±1,72	88,15±1,99
PMSF	2,38±0,49	1,14±0,46
E-64	103,32±0,21	101,97±1,02

**Tabela 6** – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da serina protease produzida pelo fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133 em fermentação submersa utilizando farelo de soja e farelo de trigo como substratos.

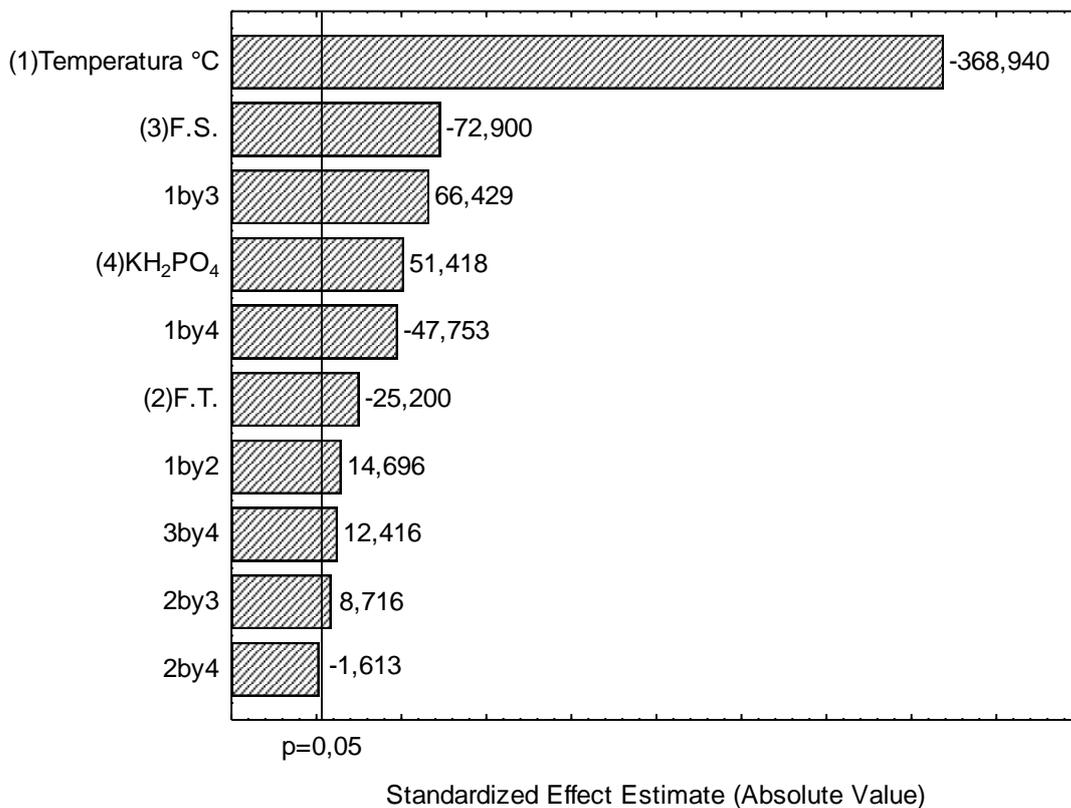
Parâmetros	<i>M. subtilissimus</i> URM 4133
$V_{max}$ (U.mg proteína <sup>-1</sup> )	333,33
$K_m$ (mg azocaseína.mL <sup>-1</sup> )	2,35
$K_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	277,78
$K_{cat}/K_m$ (s <sup>-1</sup> mg mL <sup>-1</sup> )	104,17
$E_a$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	30,13
$\Delta H^*$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	27,53
$\Delta G^*$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	62,17
$\Delta S^*$ (J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	-110,61
$\Delta G^*_{E-T}$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	-12,09
$\Delta G^*_{E-S}$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	2,22
$Q_{10}$	1,11

**Tabela 7** – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos de desnaturação térmica irreversível da serina protease purificada do *Mucor subtilissimus* URM 4133.

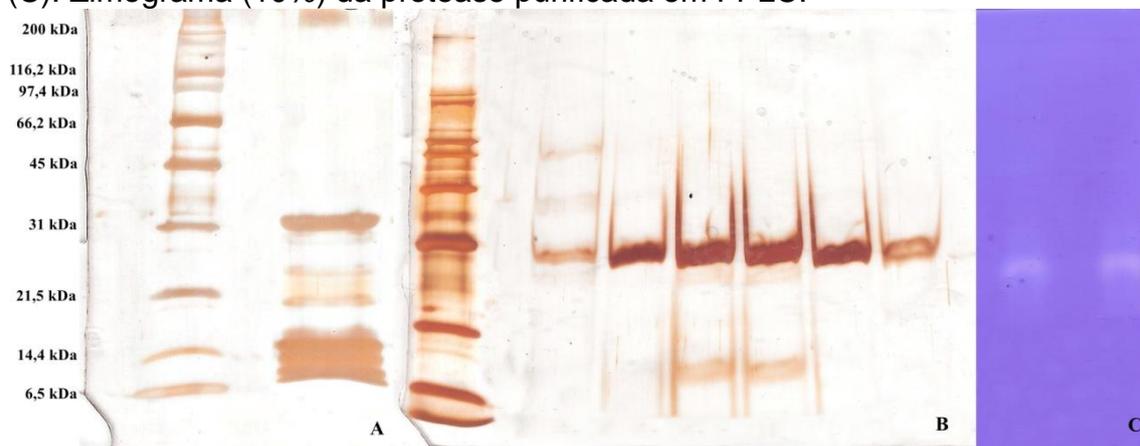
T (°C)	$k_d$ (h <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (h)	$D$ (h)	$R^2$	$\Delta H_d$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_d$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_d$ (J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	$E_d$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )
40	0,0297	23,34	77,54	0,9681	123,63	85,97	120,24	126,23
45	0,0951	7,29	24,22	0,9942	123,59	84,31	123,45	
50	0,2127	3,26	10,83	0,9905	123,54	83,51	123,87	
55	0,4952	1,40	4,65	0,9784	123,50	82,54	124,82	
60	0,7916	0,88	2,90	0,9594	123,46	82,54	122,82	

**FIGURAS**

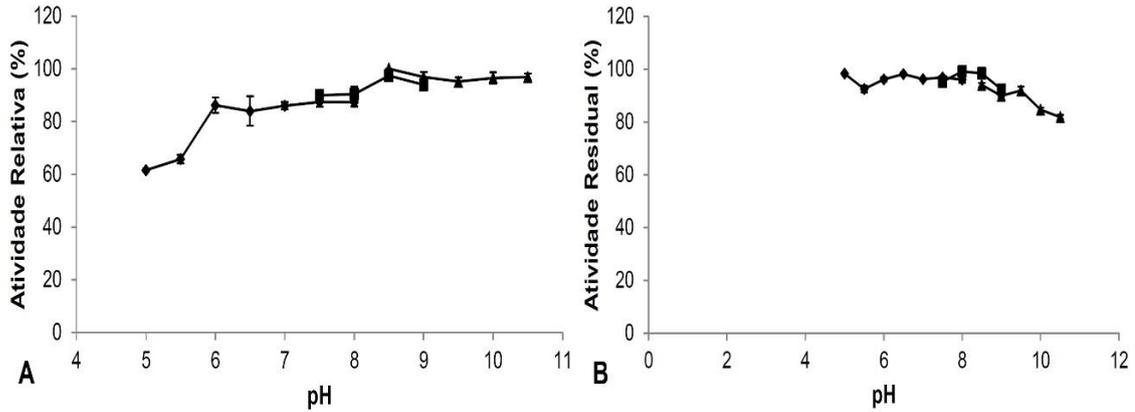
**Figura 1** – Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis independentes (Temperatura; Farelo de Trigo - F.T.; Farelo de Soja - F.S. e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) na produção de protease pelo fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133 de acordo com o planejamento fatorial completo  $2^4$ .



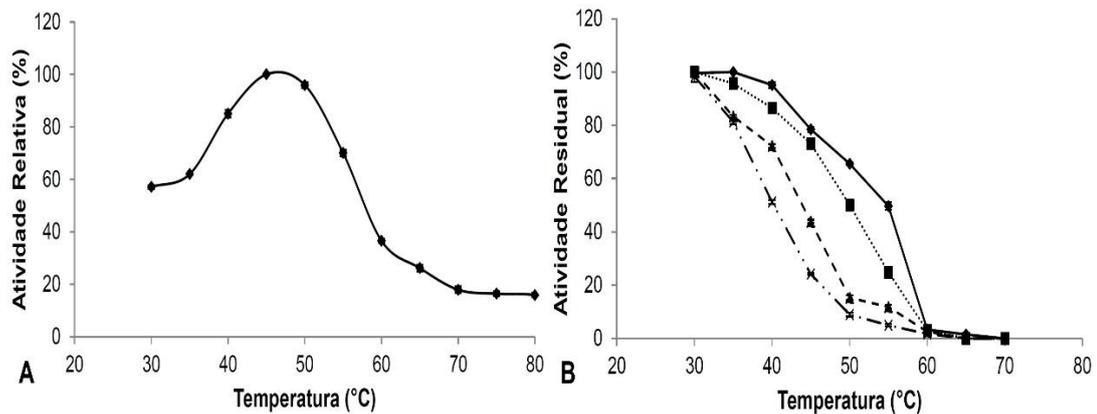
**Figura 2** – Determinação da massa molecular do extrato bruto e das frações purificadas por SDS-PAGE (10%) e zimograma, das proteínas do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133. (A). SDS-PAGE: Coluna 1, marcador molecular de proteína; Coluna 2, extrato bruto. (B). SDS-PAGE: Coluna 1, marcador molecular de proteína; Colunas 2 – 7, frações coletadas no FPLC utilizando coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) de exclusão molecular, com alto grau de pureza nas Colunas 6 e 7. (C). Zimograma (10%) da protease purificada em FPLC.



**Figura 3** – (A). pH ótimo da protease purificada produzida por fermentação submersa pelo *Mucor subtilissimus* URM 4133, nos tampões citrato – fosfato (◆), Tris – HCl (■) e carbonato – bicarbonato (▲). (B). Estabilidade ao pH da protease purificada, produzida por fermentação submersa pelo *Mucor subtilissimus* URM 4133, nos tampões citrato – fosfato (◆), Tris – HCl (■) e carbonato – bicarbonato (▲), após 24 horas de incubação.

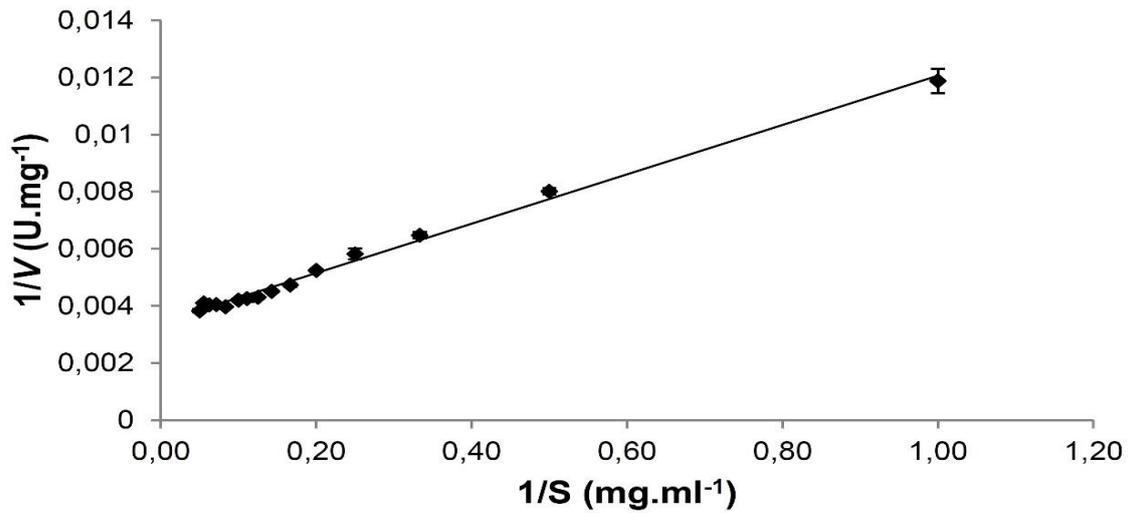


**Figura 4** – (A). Temperatura ótima da protease purificada, produzida por fermentação submersa pelo *Mucor subtilissimus* URM 4133. (B). Estabilidade térmica da protease purificada, produzida por fermentação submersa pelo *Mucor subtilissimus* URM 4133, durante 1 hora (◆); 2 horas (■); 8 horas (▲) e 24 horas (×).

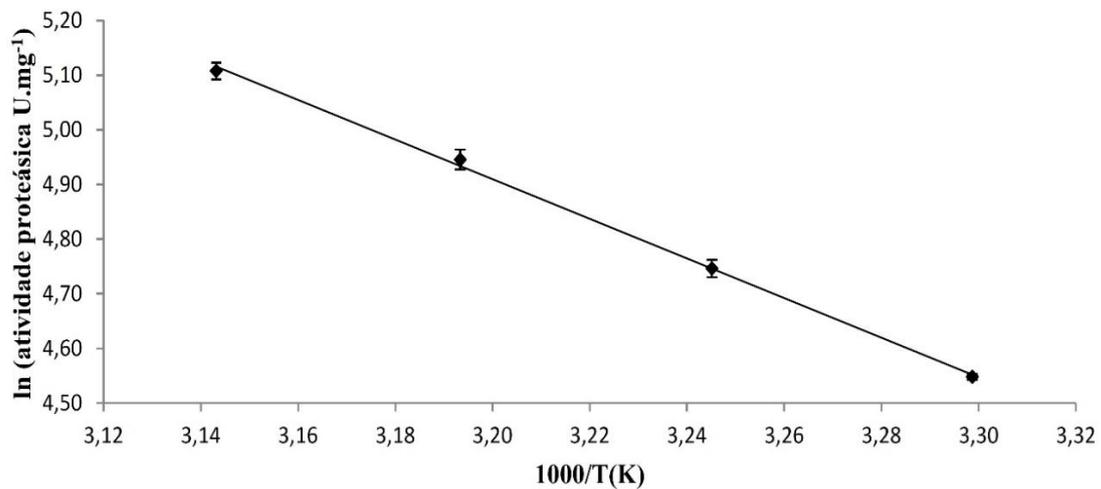


**Figura 5** – Gráfico do duplo recíproco (Lineweaver-Burk) da taxa inicial de hidrólise de azocaseína pela protease purificada do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133

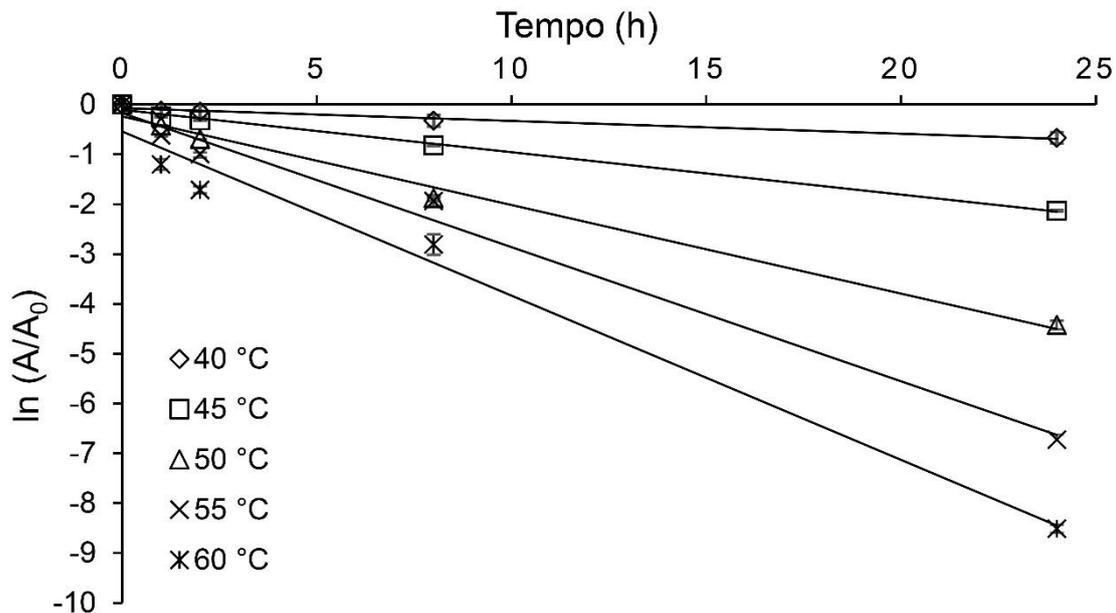
versus a concentração de azocaseína. As barras de erro representam o desvio padrão.



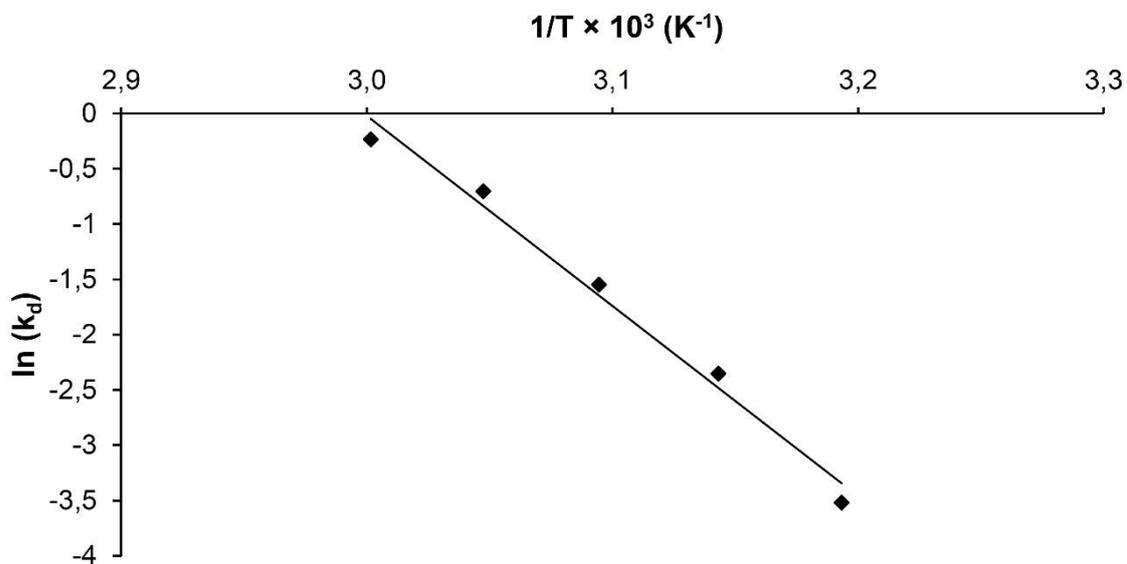
**Figura 6** – Gráfico de Arrhenius para a determinação da energia de ativação ( $E_a$ ) da serina protease purificada produzida pelo fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133.



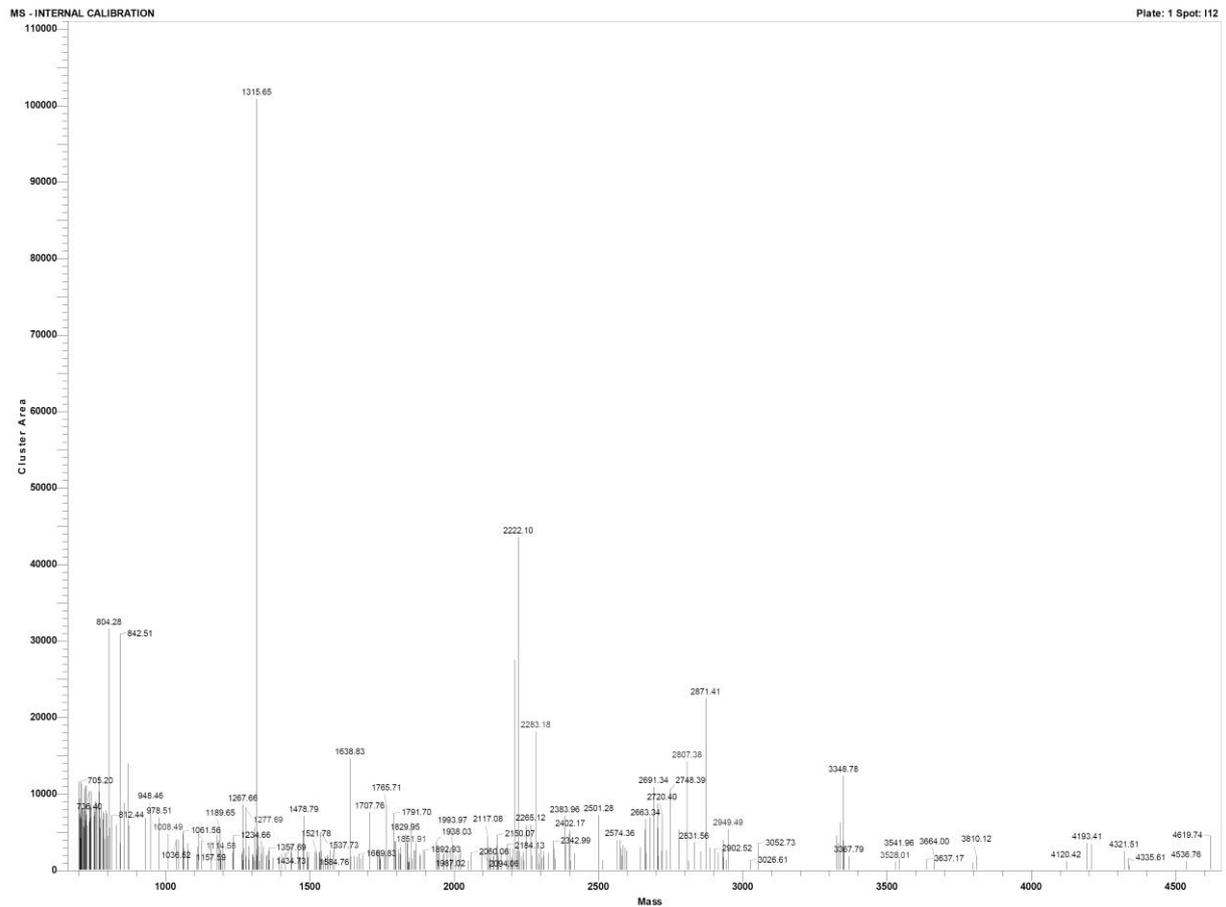
**Figura 7** – Gráfico de primeira-ordem da desnaturação térmica irreversível da serina protease purificada do *Mucor subtilissimus* URM 4133.



**Figura 8** – Gráfico de Arrhenius para calcular a energia de ativação ( $E_d$ ) da inativação/desnaturação térmica irreversível da serina protease purificada do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133.



**Figura 9 – (A).** Análise do espectro de massa MALDI-TOF da serina protease purificada produzida por *Mucor subtilissimus* URM 4133. O PMF da massa observada foi realizado utilizando o sistema de busca MASCOT.



**Figura 9 – (B)** Algumas proteínas correspondentes do banco de dado UniProt com a massa observada da serina protease purificada de *Mucor subtilissimos* URM 4133.

- [I1CSQ0](#) **Mass:** 167476 **Score:** 59 **Expect:** 0.36 **Matches:** 66  
 Uncharacterized protein OS=Rhizopus delemar (strain RA 99-880 / ATCC MYA-4621 / FGSC 9543 / NRRL 43880)
- [A0A077X1Z2](#) **Mass:** 170271 **Score:** 57 **Expect:** 0.63 **Matches:** 64  
 Uncharacterized protein OS=Lichtheimia ramosa GN=LRAMOS05466 PE=4 SV=1
- [Q8J1X9](#) **Mass:** 55014 **Score:** 54 **Expect:** 1.3 **Matches:** 28  
 70 kDa heat shock protein 1 (Fragment) OS=Rhizopus stolonifer PE=3 SV=1
- [S2JX18](#) **Mass:** 30010 **Score:** 50 **Expect:** 2.8 **Matches:** 18  
 Uncharacterized protein OS=Mucor circinelloides f. circinelloides
- [A0A1X2G5U6](#) **Mass:** 21602 **Score:** 48 **Expect:** 4.9 **Matches:** 14  
 Uncharacterized protein OS=Hesseltinella vesiculosa GN=DM01DRAFT\_264443 PE=4 SV=1
- [A0A1C7MWK9](#) **Mass:** 69744 **Score:** 48 **Expect:** 5.3 **Matches:** 30  
 Iron-sulfur clusters transporter atml, mitochondrial (Fragment) OS=Choanephora cucurbitarum

## **CAPÍTULO IV:**

**Uma nova serina protease de *Mucor guilliermondii* URM 5848:  
Purificação, caracterização bioquímica, parâmetros cinéticos e  
termodinâmicos**

## Uma nova serina protease de *Mucor guilliermondii* URM 5848: Purificação, caracterização bioquímica, parâmetros cinéticos e termodinâmicos

José Erick Galindo Gomes<sup>a</sup>, Isabel Zaparoli Rosa<sup>a</sup>, Cristina Maria de Souza-Motta<sup>b</sup>, Eleni Gomes<sup>a</sup>, Maria Manuela Estevez Pintato<sup>c</sup>, Keila Aparecida Moreira<sup>d</sup>, Roberto da Silva<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE – UNESP – Rua Cristóvão Colombo 2265, São José do Rio Preto, São Paulo, CEP 15054-000, Brasil.

<sup>b</sup>Departamento de Micologia, Centro de Biociências – UFPE – Av. Prof. Nelson Chaves s/n, Recife, Pernambuco, CEP 50670-420, Brasil

<sup>c</sup>Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa/Porto, Rua Arquitecto Lobão Vital, Apartado 2511, 4200 Porto, Portugal.

<sup>d</sup>Laboratório de Microbiologia, Tecnologia Enzimática e Bioprodutos – Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE - Avenida Bom Pastor, s/n.º, Garanhuns, Pernambuco, CEP 55292-278, Brasil

\*Autor de correspondência: [dasilva@ibilce.unesp.br](mailto:dasilva@ibilce.unesp.br)

**Resumo:** Para o aumento da produção enzimática foi utilizado planejamento estatístico fatorial 2<sup>4</sup>. A atividade proteolítica variou entre 0,51 e 10,33 U.mL<sup>-1</sup>. A protease foi purificada em sistema FPLC e após análise por SDS-PAGE e zimografia, apresentou uma massa molecular de aproximadamente 25 kDa. A caracterização bioquímica da enzima revelou uma capacidade de desempenho da atividade catalítica em uma larga faixa de pH, tanto ácido, quanto alcalino com atividade residual acima dos 60% em tampão Tris – HCl pH 9,0. No entanto, a enzima se mostrou sensível a temperaturas mais elevadas com atividade residual de 20% após 24 horas aos 45 °C e foi desnaturada logo após uma hora em temperaturas acima de 65 °C. Além disso, a protease perdeu 50% de sua atividade pela ação dos íons Hg<sup>2+</sup> e Co<sup>2+</sup> e do β-mercaptoetanol e foi completamente inibida pelo fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF). Para os parâmetros cinéticos de hidrólise do substrato azocaseína a serina protease apresentou valor de  $K_m = 2,00 \text{ mg azocaseína.mL}^{-1}$  e de  $V_{max} = 250,00 \text{ U.mg proteína}^{-1}$ . Também foram avaliados parâmetros termodinâmicos de ativação como  $E_a$  e  $Q_{10}$  e de desnaturação térmica irreversível como  $t_{1/2}$  e valor  $D$  além da entalpia ( $\Delta H$ ),

entropia ( $\Delta S$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) para ambos os casos. Não foram encontradas sequências peptídicas com confiabilidade estatística para a protease do *Mucor guilliermondii* URM 5848 após análise por MALDI-TOF, o que sugere se tratar de uma nova enzima.

**Palavras-chave:** fungo filamentoso, enzima proteolítica, desnaturação térmica

## 1. INTRODUÇÃO

As enzimas proteolíticas de forma geral são fundamentais para o funcionamento adequado e a sobrevivência de todos os seres vivos e apresentam uma participação entre 2 e 4% do proteoma total. Estas moléculas são consideradas um grupo complexo de enzimas que desempenham papéis regulatórios e nutricionais importantes na natureza (PATEL, 2017). As proteases, podem ser utilizadas em vários setores industriais como na indústria médica, farmacêutica, alimentícia, têxtil, detergentes, cosméticos, isolamento celular e tratamento de resíduos. Além disso, a formação de produtos específicos por estas enzimas é um aspecto fundamental de estudo na biotecnologia moderna (BHUNIA et al., 2013).

As proteases de origem fúngica são bastante utilizadas pela indústria devido a sua grande diversidade bioquímica, possibilidade de manipulação genética, aumento na escala de produção e por serem facilmente extraídas através de filtração simples. Além disso, várias estirpes de fungos são classificadas como “Generally Regarded As Safe” (GRAS) e a utilização dos seus metabólitos é considerada segura (PAVLUKOVA; BELOZERSKY; DUNAEVSKY, 1998; GREEN; BEEZHOLD, 2011).

Dentre estas estirpes, encontra-se o *Mucor guilliermondii* que é um fungo dimórfico do filo Zygomycota capaz de alternar seu crescimento entre estruturas leveduriformes e filamentosas, o que depende do estímulo ambiental recebido. Este fungo pertence a ordem Mucorales que compreende os gêneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Cunninghamella* e *Absidia*, conhecidos por terem potencial para produção de proteases coagulantes de leite, lipases, amilases e outras proteases extracelulares (YEGIN et al., 2011; INOKUMA; TAKANO; HOSHINO, 2013).

As serina proteases constituem um grande grupo de peptidases e sua atividade catalítica depende basicamente da interação de um nucleófilo, uma base geral e um ácido. Neste caso, a tríade catalítica das serina proteases é composta por resíduos de serina, histidina e aspartato, que apresentam arranjos espaciais semelhantes, mas,

a ordem dos resíduos na sequência de aminoácidos e na estrutura terciária são diferentes entre os grupos destas enzimas, como por exemplo, nas famílias de quimotripsina, tripsina e subtilisina (POLGÁR, 2005).

A demanda industrial de proteases com especificidade adequada, estabilidade ao pH, temperatura, íons metálicos, solventes orgânicos e compostos com propriedades detergentes como os surfactantes aumenta a busca por novas enzimas. As proteases que apresentam alta atividade em condições alcalinas e são estáveis a temperatura por longos períodos são interessantes tanto para aplicações bioquímicas, quanto biotecnológicas. Em geral, as proteases microbianas são de natureza extracelular e são secretadas diretamente no caldo de fermentação o que simplifica o processo de extração, purificação e recuperação destas moléculas em comparação as enzimas provenientes de plantas e animais (BENMRAD et al., 2016).

O estudo dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos também podem fornecer informações importantes sobre a viabilidade econômica dos processos industriais baseados na utilização dessas enzimas, principalmente sobre a sua termoestabilidade. A desnaturação térmica irreversível é expressa cineticamente em termos de meia-vida enzimática e segue uma reação de desativação de primeira ordem. Além disso, outros parâmetros como energia de ativação e as mudanças de entalpia, entropia e energia livre de Gibbs, também são utilizados para descrever e entender o processo de desnaturação térmica das enzimas. Portanto, uma alta estabilidade enzimática é considerada como vantagem econômica devido ao menor consumo de enzimas (SOUZA et al., 2015).

Desta forma, no presente estudo são mostrados os processos de produção, purificação e caracterização bioquímica, bem como, os parâmetros cinéticos e termodinâmicos de uma nova serina protease extracelular, produzida pelo fungo filamentosso *Mucor guilliermondii* URM 5848.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Micro-organismo**

O fungo filamentosso *Mucor guilliermondii* URM 5848 foi disponibilizado pela Micoteca URM do Departamento de Micologia/Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco. Este micro-organismo é descrito pela literatura como produtor de protease e não apresenta produção de micotoxinas. Este fungo foi mantido em tubo de ensaio que continha o meio de cultura ágar extrato de malte e

repicado a cada trinta dias. O meio de cultura utilizado para esporulação foi o batata dextrose ágar (BDA).

## **2.2. Produção de protease**

Em frascos Erlenmeyers com capacidade para 125 mL, foi realizado planejamento fatorial completo  $2^4$  (Tabela 1) com o propósito de avaliar as melhores condições e os fatores que influenciaram a produção de protease pelo fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848. O inóculo foi padronizado a  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>. A produção enzimática ocorreu em sistemas de fermentação submersa durante 96 horas a 35 °C. O extrato enzimático bruto foi obtido por meio de filtração. A atividade proteolítica foi utilizada como variável resposta, e analisada pelo programa Statistica 8.0. As diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) foram identificadas pelo método de Tukey com a utilização do software SPSS.

## **2.3. Atividade proteolítica e proteína total**

A atividade proteolítica foi realizada de acordo com o método descrito por Leighton et al. (1973), que utiliza a azocaseína 1% (m/v), diluída em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2, como substrato. Para a reação, 60 µL do extrato enzimático foram adicionados a 100 µL do substrato e a mistura reacional incubada na ausência de luz durante 1 hora. Posteriormente, 480 µL de ácido tricloroacético 10% (m/v) foram adicionados e os ensaios centrifugados durante 5 minutos a 3000 x g e 4 °C. Logo após, 320 µL do sobrenadante foram misturados a 560 µL de hidróxido de sódio 1 M. A atividade enzimática foi definida como a variação de 0,01 na absorvância a 440 nm durante uma hora. As dosagens enzimáticas foram expressas em U.mL<sup>-1</sup>, e todos os ensaios realizados em triplicata.

Para determinar as proteínas totais das amostras foi utilizado o método descrito por Bradford (1976). Neste caso, 50 µL do extrato enzimático foram adicionados a 1,5 mL do reagente de Bradford. A curva de calibração foi realizada com soro albumina bovina (BSA) como padrão, processada em uma gama de concentrações (10-1000 µg.mL<sup>-1</sup>). Estes ensaios foram lidos em espectrofotômetro a 595 nm. As dosagens de proteína foram expressas em mg.mL<sup>-1</sup> e todos as análises realizadas em triplicata.

## **2.4. Eletroforese SDS-PAGE e zimograma**

As eletroforeses SDS-PAGE tanto do extrato bruto, quanto das alíquotas da enzima purificada, foram realizadas de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). As amostras foram liofilizadas, concentradas 10 vezes e ressuspendidas em tampão (2X Laemmli Sample Buffer) da Bio-Rad Laboratories. O gel de empilhamento foi elaborado com 3% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 e o gel de separação 10% em tampão Tris-HCl 0,37 M, pH 8,8. O padrão de massa molecular (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range) da Bio-Rad Laboratories era composto por miosina (200 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116,25 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), albumina sérica (66,2 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa) e aprotinina (6,5 kDa). A corrida das amostras no gel foi realizada a 150 V durante 100 minutos. As bandas foram reveladas através do processo de coloração com nitrato de parata.

A atividade enzimática foi detectada por técnica de zimografia, segundo o método de Egito et al. (2007) em condições não desnaturantes. A eletroforese SDS-PAGE foi realizada mediante géis de poliacrilamida que continham 1% de caseína como substrato enzimático. Para esta finalidade, a amostra purificada também foi liofilizada, concentrada 10 vezes e ressuspendida em tampão (Zymogram Sample Buffer) da Bio-Rad Laboratories. Após a migração eletroforética o gel foi lavado com Triton X-100 2,5% por 30 min. à 4 °C. A reação de hidrólise foi realizada no interior do gel durante a incubação a 37 °C por 48 horas em um banho de Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5. Posteriormente, a detecção das proteases, ocorreu através da solução corante com 40% (v/v) de etanol, 10% (v/v) de ácido acético e 0,1% (m/v) de Coomassie Brilliant Blue (Sigma Aldrich), durante 60 minutos. Logo após, foi adicionado à solução descorante composta por 30% (v/v) de etanol e 7,5% (v/v) de ácido acético até o surgimento de bandas translúcidas.

## **2.5. Purificação da protease**

Para a purificação da enzima, utilizou-se o sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography - Äkta Purifier 900 GE Healthcare) e o processo foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa, foi acoplado ao sistema FPLC uma coluna HiTrap DEAE FF, 1mL (HiTrap IEX Selection Kit – GE Healthcare) e utilizado como eluente A o tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,5 e, como eluente B, o tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,5 com 1 M de NaCl. Foi utilizado gradiente linear e fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. O extrato

parcialmente purificado foi liofilizado, concentrado 2 vezes, ressuspendido em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,5, com 100 mM de glicina.

Para a segunda etapa de purificação, foi feito uso de uma coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) de exclusão molecular. Nesse caso, o tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,5, que continha 100 mM de glicina foi utilizado como único eluente com um fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> e um fracionamento de 0,5 mL por microtubo. Posteriormente, foi realizada eletroforese SDS-PAGE, como descrito no item 2.4., para verificar o grau de pureza do processo.

## **2.6. Caracterização bioquímica da protease**

### **2.6.1. Temperatura e pH ótimos**

Para a realização dos ensaios de pH ótimo, o substrato reacional azocaseína foi diluído nos seguintes tampões: citrato – fosfato 0,2 M (pH: 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0); Tris – HCl 0,2 M (pH: 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0) e carbonato – bicarbonato 0,2 M (pH: 8,5; 9,0; 9,5; 10,0 e 10,5) e a atividade proteolítica realizada para cada pH. Posteriormente, no estudo da temperatura ótima da protease purificada, o substrato foi utilizado no pH ótimo obtido na análise anterior e a atividade proteolítica realizada em uma faixa de temperatura que variou entre 30 °C e 85 °C. As atividades enzimáticas foram expressas em atividade relativa (%).

### **2.6.2. Estabilidade à temperatura e ao pH**

Para verificar a estabilidade térmica da protease, a enzima purificada foi incubada nas temperaturas entre 30 °C e 70 °C. E para a estabilidade ao pH, a enzima foi diluída (1:1 v/v) nos mesmos tampões utilizados no estudo do pH ótimo. Em ambos os casos, a estabilidade da protease foi avaliada ao longo do tempo, portanto, foram aliqüotadas amostras no período de 0, 1, 2, 8 e 24 horas.

O monitoramento da atividade proteolítica, tanto para o estudo de estabilidade à temperatura, quanto para o estudo de estabilidade ao pH, foi avaliado pela incubação das alíquotas retiradas em seus respectivos tempos, nas condições de temperatura e pH ótimo obtidos anteriormente. As atividades enzimáticas foram expressas em atividade residual (%).

### **2.6.3. Efeito de íons metálicos, surfactantes e inibidores na atividade proteásica**

Para avaliar a interferência dos íons metálicos sobre a atividade proteásica, foram utilizados sais nas concentrações finais de 1 mM e 5 mM com os seguintes íons metálicos:  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Co^{2+}$ . Substâncias específicas conhecidas como inibidoras de protease, foram testadas. Deste modo, os seguintes inibidores foram utilizados, nas concentrações finais de 0,5 e 1 mM: fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF), um inibidor de serina-proteases; ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA), que apresenta ação de inibição em metalo-proteases; pepstatina-A, com inibição para aspártico proteases e o inibidor E-64, utilizado na inibição de cisteíno-proteases.

Além disso, substâncias orgânicas como o dodecil sulfato de sódio (SDS) Triton X-100, Tween-20, Tween-80,  $\beta$ -mercaptoetanol e DMSO, foram utilizadas nas concentrações finais de 0,1% e 0,25% (m/v) e analisadas para verificar se causam interferência na atividade enzimática.

## 2.7. Determinação dos parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{max}$

Azocaseína (tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0) foi utilizada como substrato, em uma gama de concentrações que variou de 1 – 20  $mg \cdot mL^{-1}$ , para determinar os parâmetros cinéticos  $V_{max}$  e  $K_m$  da protease produzida pelo fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848. Os ensaios de atividade proteolítica foram realizados a 40 °C. Tanto a velocidade máxima ( $V_{max}$ ), quanto à constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) foram obtidas por meio da equação de Lineweaver-Burk (equação 1), plotando-se um gráfico de regressão linear a partir das velocidades de reação nas diferentes concentrações de substrato.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1)$$

A constante catalítica ( $k_{cat}$ ), que representa quantas moléculas do substrato uma enzima consegue catalisar por segundo e também é conhecida como *turnover number*, foi calculada de acordo com a equação 2. Além disso, a eficiência da enzima em converter o substrato, mesmo em baixas concentrações, em produto, foi representada de acordo com o quociente da divisão entre  $\frac{k_{cat}}{K_m}$ .

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]} \quad (2)$$

Onde  $[E]$ , é a concentração de proteínas em  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

## 2.8. Energia de ativação e coeficiente de temperatura ( $Q_{10}$ )

Para a determinação da energia de ativação ( $E_a$ ), a enzima foi incubada com 1% (m/v) de azocaseína em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0 e a temperatura variou entre 30 – 40 °C. A lei de Arrhenius foi utilizada para considerar a dependência das constantes de velocidade com a temperatura e a  $E_a$  foi calculada a partir da inclinação do gráfico de  $\ln$  (atividade proteásica) *versus*  $1000/T$ . Onde,  $E_a = - \text{slope} \times R$ ,  $R$  corresponde a constante universal dos gases ( $8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) e  $T$  é a temperatura absoluta em Kelvin (K) (CASTRO et al., 2015).

O efeito da temperatura sobre a taxa de reação foi expresso em termos de coeficiente de temperatura ( $Q_{10}$ ), que corresponde a taxa de aumento da reação enzimática com o aumento da temperatura a cada 10 °C. Este coeficiente foi determinado pela equação 3, sugerida por Dixon e Webb (1979).

$$Q_{10} = \text{Antilog}E = (E_a \times 10/RT^2) \quad (3)$$

Onde  $E$  é igual a energia de ativação ( $E_a$ ).

## 2.9. Termodinâmica da reação enzimática

Os parâmetros termodinâmicos para a compreensão do comportamento reacional da protease antes do seu estado de desnaturação foram calculados segundo Javed et al., (2009), que usaram a equação de taxa absoluta de Eyring (equação 4), derivada a partir da teoria do estado de transição (EYRING; STEARN, 1939).

$$k_{cat} = \left(\frac{k_b T}{h}\right) \times e^{\left(\frac{-\Delta H^*}{RT}\right)} \times e^{\left(\frac{\Delta S^*}{R}\right)} \quad (4)$$

Onde,  $k_b$  corresponde a constante de Boltzmann ( $1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ );  $T$  é equivalente a temperatura absoluta em Kelvin (K);  $h$  compreende a constante de Planck ( $6,626 \times 10^{-34} \text{ Js}$ );  $R$  é a constante universal dos gases ( $8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ );  $\Delta H^*$  é a entalpia de ativação e  $\Delta S^*$  a entropia de ativação.

Para os cálculos da entalpia de ativação ( $\Delta H^*$ ), entropia de ativação ( $\Delta S^*$ ) e energia livre de ativação de Gibbs ( $\Delta G^*$ ), do sistema de reação enzimática, foram utilizadas as seguintes equações:

$$\Delta H^* = E_a - RT \quad (5)$$

$$\Delta G^* = -RT \ln \left( \frac{k_{cat} h}{k_b x T} \right) \quad (6)$$

$$\Delta S^* = \frac{(\Delta H^* - \Delta G^*)}{T} \quad (7)$$

Além disso, a energia livre de ligação com o substrato ( $\Delta G^*_{E-S}$ ) e da formação do estado de transição ( $\Delta G^*_{E-T}$ ), que indicam se a conversão espontânea do substrato em produto requer uma baixa energia ou não, foram calculadas através das seguintes derivações:

$$\Delta G^*_{E-S} = -RT \ln \left( \frac{1}{K_m} \right) \quad (8)$$

$$\Delta G^*_{E-T} = -RT \ln \left( \frac{k_{cat}}{K_m} \right) \quad (9)$$

## 2.10. Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de inativação térmica

O estudo de inativação térmica da protease foi realizado na ausência do substrato. A enzima foi incubada em tampão Tris-HCl (20 mM, pH 8,0) em várias temperaturas (45 °C a 65 °C), as alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 1, 2, 8 e 24 horas e imediatamente arrefecidas em banho de gelo durante 30 minutos. A atividade residual da amostra foi determinada com o substrato padrão dentro das condições de pH e temperatura ótimos.

O valor da constante de velocidade de desativação ( $k_d$ ) foi expressa como um decaimento exponencial e encontrada plotando  $\ln(A/A_0)$  versus o tempo. A energia de desnaturação ( $E_d$ ) foi determinada pelo gráfico de Arrhenius, plotando  $\ln(k_d)$  em função de  $1000/T$  em Kelvin (ABDEL-NABY et al., 2017).

O tempo aparente de meia-vida da enzima, definido como o tempo em que a atividade residual atinge 50%, foi estimado pela relação de  $0,693/k_d$ . O tempo de redução decimal (valor  $D$ ), definido como o tempo requerido para a redução de 90% ou um-log 10 da atividade enzimática inicial em uma determinada temperatura, está relacionado com a constante de desativação ( $k_d$ ) e foi calculado como mostrado na equação 10:

$$D = 2,303/k_d \quad (10)$$

A termodinâmica de desnaturação enzimática foi determinada através do rearranjo da equação de taxa absoluta de Eyring, derivada da teoria do estado de transição, como mostrado na equação 11:

$$k_d = \left(\frac{k_b T}{h}\right) \times e^{\left(\frac{-\Delta H_d}{RT}\right)} \times e^{\left(\frac{\Delta S_d}{R}\right)} \quad (11)$$

Onde  $\Delta H_d$ ,  $\Delta G_d$  e  $\Delta S_d$  de desnaturação, foram calculados de acordo com as equações 5, 6 e 7, com as modificações que na equação 5,  $E_d$  foi usado ao invés de  $E_a$ , assim como na equação 6,  $k_d$ , foi usado no lugar de  $k_{cat}$ .

### 2.11. Prospecção peptídica por espectrometria de massa (MALDI-TOF)

A análise da sequência peptídica da protease foi realizada por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF (4800 Plus, SCIEX). Para isto, a amostra foi preparada segundo a metodologia proposta por Osório e Reis (2013). A banda do gel que continha a enzima purificada foi submetida ao processo de digestão com tripsina. Posteriormente, a amostra foi enriquecida por cromatografia em C18 de fase reversa (ZipTips, Millipore) seguindo as instruções do fabricante e eluída na placa de MALDI com uma solução de eluição do ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico da matriz MALDI a 8 mg.ml<sup>-1</sup> em 50% de acetonitrila (ACN), 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) e fosfato de amônio 6 mM. Os espectros de massa das sequências foram adquiridos em modo reflector positivo na faixa de massa de m/z 700-5000. Os picos com maior intensidade foram selecionados para determinar a sequência de peptídeo por MS/MS. As proteínas foram identificadas pela abordagem Peptide Mass Fingerprint + MS/MS com o software Mascot (v2.5.1, Matrix Science) usando o banco de dados da sequência de proteína UniProt para a seleção taxonômica Mucoromycota (versão 2017\_08). As configurações de pesquisa de proteínas foram a oxidação da metionina (modificação variável), zero clivagens perdidas e tolerância máxima de erro de 50 ppm (MS) e 0,5 Da (MS/MS). As pontuações de proteínas superiores a 67 foram consideradas significativas (p <0,05).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Produção de proteases

Os resultados experimentais obtidos a partir da utilização de planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> (Tabela 2), mostram que o ensaio 9 foi estatisticamente diferente

dos demais e apresentou a melhor combinação de variáveis para a produção de protease pelo fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848, com valor máximo de atividade proteolítica de  $10,334 \pm 0,073$  U.mL<sup>-1</sup>. Nascimento et al. (2015) avaliaram a produção de proteases com diferentes composições no meio de fermentação e observaram atividade proteolítica para a enzima produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262, que variou entre 9,87 e 38,08 U.mL<sup>-1</sup>. Já, Yegin, Goksungur e Fernandez-Lahore (2012), trabalharam com a produção de protease a partir de *Mucor mucedo* DSM 809, através de sistema de fermentação submersa e meio composto por caseína, glicose e uma solução de minerais com fosfato de potássio monobásico e atingiu uma produção máxima de  $5,4 \pm 0,8$  U.mL<sup>-1</sup>.

A análise de variância mostrou que todas as interações foram significativas (Tabela 3). O ajuste do modelo, medido pelo coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>), apresentou valor de 0,99977 e R<sup>2</sup><sub>ajuste</sub> = 0,99951, ou seja, 99,99% da variação total da produção de protease foi explicada pelo modelo estatístico e a falta de ajuste, também não foi significativa.

Uma menor temperatura no processo de fermentação foi determinante para o aumento da produção de proteases como ilustrado na Figura 1. A variável apresentou um efeito extremamente negativo e foi o principal fator de influência na produção da enzima. Este comportamento pode ser explicado devido ao fato de que, em geral, as condições ótimas para o crescimento de espécies de fungos filamentosos do gênero *Mucor* spp. encontram-se em temperatura ambiente em torno de 25 °C, como foi observado por Sautour et al. (2002), para *Mucor racemosus*. E também por Morin-Sardin et al. (2016), que apresentaram resultados de temperatura ótima para crescimento de diversas espécies de *Mucor* entre 21,4 °C e 29,2 °C e temperatura máxima entre 25,8 °C e 40,9 °C.

Além disso, Blanco et al. (2016), trabalharam com design experimental para a produção de protease por *Bacillus subtilis* e obtiveram resultados bastante díspares entre os ensaios, com atividades proteolíticas que variam entre 2,64 e  $9,48 \pm 0,00$  U.mL<sup>-1</sup>. Isto mostra que, a utilização de planejamentos estatísticos como ferramenta de produção enzimática, já resulta em influências significativas, uma vez que, possibilita a observação de quais variáveis apresentam influência direta sobre a síntese das enzimas.

### 3.2. Purificação das proteases

O perfil eletroforético por SDS-PAGE das proteínas presentes no extrato bruto do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848, revelou a presença de bandas densas com massa molecular que variou entre 95 kDa e 6,5 kDa aproximadamente (Figura 2A). Os procedimentos de purificação em sistema FPLC foram eficientes no grau de pureza como pode ser observado nas Figura 2B e na Tabela 4. A técnica de zimografia também revelou que a protease do fungo URM 5848, apresenta massa molecular de aproximadamente, 25 kDa (Figuras 2C).

A diversidade de enzimas proteolíticas presentes em extratos de origem fúngica estimula diretamente a busca de novas proteases a partir da utilização destes micro-organismos. Hsiao et al. (2014) trabalharam com o fungo *Rhizopus oryzae* e observaram a presença de uma aspártico protease com massa molecular em torno de 39 kDa. Enquanto que, Yadav et al. (2015) trabalharam com o fungo *Aspergillus flavus* MTCC 9952 e observaram a presença de uma serina protease com massa molecular de 38 kDa. Desta forma, pode-se observar a variedade de enzimas proteolíticas que podem ser produzidas por diferentes espécies fúngicas.

### **3.3. Caracterização bioquímica das proteases purificadas**

#### **3.3.1. Efeito do pH na atividade enzimática e estabilidade**

O efeito do pH utilizando sistema tampão na atividade da protease, sugere que, o intervalo de pH influenciou a atividade enzimática e não a composição do tampão. O maior valor de atividade relativa foi obtido em pH 8,0 (100%±0,00) em tampão Tris – HCl. No entanto, pode-se observar na Figura 3A que a protease apresentou resultados satisfatórios ao longo de toda a faixa de pH, com menor atividade proteolítica em pH 10,5 (68,08%±3,34) tampão carbonato-bicarbonato.

Kumar et al. (2005), obtiveram uma protease com pH ótimo de 5,5 produzida por *Rhizopus oryzae*. Salihi, Asoodeh e Aliabadian (2017), utilizaram o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* CH93 e detectaram a produção de uma protease alcalina com pH ótimo de 8,0. Já Yegin, Goksungur e Fernandez-lahore (2012) trabalharam com o fungo *Mucor mucedo* DSM 809 e obtiveram uma protease ácida, com pH ótimo de 5,0 e com inativação da protease em pH 7,0. Desta forma, pode-se observar que a protease produzida pelo micro-organismo do presente trabalho, apresenta bom desempenho para atividade proteolítica em largas faixas de pH, tanto ácidas, quanto alcalinas.

Com relação ao estudo de estabilidade ao pH, a protease produzida pelo fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848, apresentou boa estabilidade na faixa de pH entre 5,0 e 8,5 e permaneceu acima de 70% de atividade residual em tampão Tris – HCl após 24 horas de incubação (Figura 3B). Entretanto, a enzima não apresentou boa estabilidade em tampão carbonato – bicarbonato e foi desnaturada em pH 10,0 e 10,5. Desta forma, com relação ao pH, não é aconselhável que a biomolécula em questão seja utilizada em pHs muito alcalinos.

Shirasaka et al. (2012) trabalharam com protease produzida por *Aspergillus oryzae* KSK3A e observaram após 4 horas de incubação em uma faixa de pH entre 3,0 e 11,0, melhor atividade residual entre os pHs 5 e 9. As atividades permaneceram acima dos 40% e não houve desnaturação enzimática. Já Nascimento et al. (2017), apresentaram como melhores resultados para a estabilidade de uma protease sintetizada por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 na faixa de pH entre 6,0 e 8,5.

### 3.3.2. Efeito da temperatura na atividade enzimática e estabilidade

O estudo de temperatura ótima revelou que a protease purificada a partir de *Mucor guilliermondii* URM 5848 foi ativa acima dos 60% na faixa de temperatura entre 30 °C – 45 °C e apresentou atividade máxima aos 40 °C (100%±0,00). Entretanto, pode-se observar na Figura 4A que a atividade enzimática foi comprometida a partir dos 50 °C com uma queda brusca aos 55 °C (19,52%±0,48) e com valor mínimo de 9,90%±0,89 aos 85 °C.

Preetha e Boopathy (1997), trabalharam com uma protease sintetizada pelo fungo *Rhizomucor miehei* e observaram condições de temperatura ótima aos 35 °C assim como Nascimento et. al (2016) que avaliaram uma protease com capacidade fibrinolítica produzida pelo *Mucor subtilissimus* UCP 1262. Já Nouani et al. (2009), apresentaram melhor condição de temperatura ótima aos 50 °C para a protease do fungo *Mucor pusillus*, entretanto, a enzima foi completamente desnaturada aos 65 °C, o que não ocorreu no presente trabalho.

Para o estudo de estabilidade térmica, a protease purificada se manteve com 100% de atividade residual até os 40 °C após 2 horas, entretanto, um aumento de 5 °C na temperatura fez com que a atividade proteolítica caísse para 63,79%±1,07 após 2 horas de incubação (Figura 4B). Apesar disso, a enzima se manteve ativa até 8 horas após sua exposição à faixa de temperatura aplicada e apresentou atividade residual de 2,17%±0,95 aos 65 °C. Após 24 horas de incubação, a enzima foi

desnaturada em temperaturas superiores a 55 °C. Dessa forma, a enzima pode ser considerada como termolábil, ou seja, que é inativada quando exposta a temperaturas mais elevadas.

Sun et al. (2018) trabalharam com uma protease do fungo *Rhizomucor miehei* expressa em *Pichia pastoris* e observaram que a enzima foi completamente desnaturada aos 65 °C. Assim como Areces et al. (1992) que trabalharam com a protease de *Mucor bacilliformes*, uma espécie mesofílica, que apresentou atividade residual de 29% a 55 °C e de apenas 8% após 30 minutos de incubação a 60 °C. Já Nascimento et al. (2015), trabalharam com uma protease sintetizada por *Acremonium* sp. L1-4B e observaram desnaturação enzimática somente após 3 horas de incubação a 50 °C.

### 3.3.3. Efeito de íons metálicos, compostos orgânicos e inibidores

Foi avaliado o efeito de várias substâncias sob a atividade da enzima purificada, dentre elas, vários íons metálicos nas concentrações de 1 mM e 5 mM, compostos orgânicos (0,10% e 0,25%), assim como inibidores específicos para proteases (0,5 mM e 1 mM), como apresentado na Tabela 5. Apenas o íon  $Mn^{2+}$  foi capaz de aumentar ligeiramente a atividade enzimática. Enquanto que, houve inibição acentuada da atividade para o íon  $Hg^{2+}$  em ambas as concentrações e para o íon  $Co^{2+}$  apenas na concentração de 5 mM.

Resultados semelhantes foram encontrados por Sun et al. (2018), que apresentaram drástica inibição da atividade enzimática com a utilização de uma concentração de 1 mM de  $Hg^{2+}$  para a protease do fungo *Rhizomucor miehei* expressa em *Pichia pastoris*. Assim como para Yadav et al. (2015), que trabalharam com uma serina protease alcalina produzida por *Aspergillus flavus* MTCC 9952 e também observaram ativação para o íon  $Mn^{2+}$  na maior concentração e inibição da atividade proteolítica pelo mercúrio.

Dentre os compostos orgânicos avaliados, o dodecil sulfato de sódio (SDS) foi responsável por inibição parcial da atividade apenas em sua maior concentração, diferente do  $\beta$ -mercaptoetanol, uma substância com ação desnaturante de proteínas, que inibiu parcialmente a protease em todas as concentrações avaliadas (0,10%-0,25%). Os surfactantes Triton X-100, Tween-20 e Tween-80, assim como o solvente polar dimetilsulfóxido (DMSO), não apresentaram efeitos consideráveis na atividade residual da enzima. Souza et al. (2017), também observaram que uma baixa

concentração de SDS (1 mM) não foi capaz de afetar a atividade da protease produzida pelo fungo *Aspergillus foetidus*. Uma serina protease proveniente do fungo *Myceliophthora* sp. apresentou resultados semelhantes para Triton X-100 e Tween-20, entretanto, para o Tween-80 a atividade proteolítica foi reduzida a 20%, e completamente desnaturada em SDS (ZANPHORLIN et al., 2011).

No estudo de inibidores enzimáticos para proteases pode-se observar que a enzima foi completamente inibida pelo fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF), um inibidor irreversível para serina proteases. Isto confere uma visão primária sobre a natureza da enzima e do seu sítio ativo e leva a concluir que esta protease purificada, pertence a esta família de enzimas. São retratados na literatura, outros tipos de espécies de *Mucor* que secretam serina proteases, como a protease excretada pelo fungo *Mucor racemosus* (DI SANTO et al., 1992) e a protease fibrinolítica produzida pelo *Mucor subtilissimus* UCP 1262, utilizado por Nascimento et al. (2016).

### 3.4. Parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{max}$

Para a estimativa dos parâmetros cinéticos  $V_{max}$  e  $K_m$  da protease purificada do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848, os testes adicionais foram realizados à temperatura de 40 °C e pH 8,0, com variação na concentração de substrato entre 1-20 mg.mL<sup>-1</sup>. Os resultados foram plotados de acordo com o gráfico do duplo recíproco (Lineweaver-Burk) apresentado na Figura 5. A enzima mostrou seguir, com boa correlação ( $R^2 = 0,996$ ), a cinética do tipo Michaelis-Menten com valores de  $K_m = 2,00$  mg azocaseína.mL<sup>-1</sup> e  $V_{max} = 250,00$  U.mg proteína<sup>-1</sup>, como pode ser observado na Tabela 6. É difícil comparar estes resultados com os da literatura uma vez que, a atividade enzimática depende do tipo de substrato utilizado e não há relatos destes parâmetros cinéticos para proteases de fungo do gênero *Mucor* utilizando azocaseína. No entanto, Negi e Banerjee (2009), avaliaram a produção de protease por *Aspergillus awamori* e obtiveram valores de  $K_m = 1,08$  mg azocaseína.mL<sup>-1</sup> e  $V_{max} = 8,834$  mg.mL<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. Já Castro e Sato (2014), trabalharam com diferentes substratos para a produção de protease por *Aspergillus niger* e observaram valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  que variam entre 0,44–1,32 mg azocaseína.mL<sup>-1</sup> e 126,51–223,13 U.mg proteína<sup>-1</sup>, respectivamente.

### 3.5. Energia de ativação e coeficiente de temperatura ( $Q_{10}$ )

A energia de ativação ( $E_a$ ) da protease foi calculada com temperaturas entre 30 °C e 40 °C. O gráfico de Arrhenius (Figura 6) mostrou uma variação linear com o aumento da temperatura, o que sugere que a serina protease do *Mucor guilliermondii* URM 5848 possui uma conformação única até atingir a faixa de transição para a desnaturação. A  $E_a$  apresentou valor positivo de 19,91 kJ.mol<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0,9877$ ), ou seja, as reações de catálise suprimem a desativação enzimática até o ponto de temperatura ótima. Esse resultado indica que a quantidade de energia necessária para que ocorra a formação do complexo enzimático de hidrólise da azocaseína, não é alta, o que torna sua capacidade hidrolítica eficaz. Souza et al. (2015), trabalharam com uma protease sintetizada pelo *Aspergillus foetidus* e observaram uma energia de ativação semelhante ( $E_a = 19,03$  a  $62,0$  kJ.mol<sup>-1</sup>). Já Lario et al. (2015), observaram uma maior energia de ativação ( $E_a = 45,5$  kJ.mol<sup>-1</sup>) para a protease sintetizada por uma levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L7 isolada da Antártica.

O efeito da temperatura na taxa de reação da serina protease sintetizada por *Mucor guilliermondii* URM 5848 apresentou valor de  $Q_{10} = 1,07$  aos 45 °C. O coeficiente de temperatura ( $Q_{10}$ ) é um parâmetro cinético utilizado para inferir se as reações catalíticas são controladas pela temperatura, ou por outros fatores. Geralmente, as reações enzimáticas mostram que o valor de  $Q_{10}$  varia entre 1 e 2. Um desvio destes valores indica um envolvimento de outros valores além da temperatura no controle da taxa de reação. Além disso, os valores de  $Q_{10}$  não parecem diferir significativamente entre as classes de enzimas, mesmo para as termofílicas (ELIAS et al. 2014).

### 3.6. Termodinâmica da reação enzimática

Os parâmetros termodinâmicos de hidrólise do substrato (azocaseína) para serina protease purificada do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848 estão apresentados na Tabela 6. Resumidamente, a entalpia de ativação ( $\Delta H^*$ ) apresentou valor de 17,30 kJ.mol<sup>-1</sup> e a entropia de ativação ( $\Delta S^*$ ) um valor negativo de -142,07 J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>. Segundo Bhatti et al. (2007), a correlação entre uma baixa entalpia e um valor negativo para entropia, sugere a formação de um estado de transição eficiente e mais ordenado para o complexo enzima-substrato ( $ES^*$ ). Silva et al. (2017) trabalharam com uma protease do fungo *Aspergillus tamarisii* URM 4634 e obtiveram valores para o  $\Delta H^*$  de 31,90 kJ.mol<sup>-1</sup> e 13,90 kJ.mol<sup>-1</sup>, nos extratos bruto e purificado, respectivamente. Já, Lima et al. (2011) estudando a protease produzida por

*Penicillium aurantiogriseum* URM 4622, observaram valor para a entalpia de ativação de  $108 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , resultado muito elevado em comparação ao obtido no presente trabalho.

Segundo Riaz et al. (2007), a dimensão e a viabilidade de uma reação enzimática é melhor avaliada pela mensuração da mudança na energia livre de ativação ( $\Delta G^*$ ) para a conversão de um complexo enzima-substrato em produto. Dessa forma, baixos valores de  $\Delta G^*$  indicam que a conversão do estado de transição do complexo enzima-substrato em produto foi mais espontânea. Desta forma, os baixos valores apresentados no presente trabalho (Tabela 6), tanto para a energia livre de transição ( $\Delta G^*_{E-T}$ ), quanto para a energia livre de ligação ( $\Delta G^*_{E-S}$ ), sugerem que a serina protease produzida por *Mucor guilliermondii* URM 5848 necessita de uma baixa quantidade de energia para a formação do complexo ativado (transição) e para a ligação do substrato ao estado de transição, conseqüentemente, apresenta uma boa eficiência de catálise devido a rápida estabilização do complexo  $ES^*$ .

### 3.7. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos de inativação térmica

Para a determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de inativação térmica irreversível da serina protease purificada do *Mucor guilliermondii* URM 5848, foram utilizados os dados obtidos durante o estudo de estabilidade térmica enzimática e o gráfico de Arrhenius (Figura 7) foi plotado entre as temperaturas de  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ . Como já é conhecido, o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) corresponde ao tempo necessário para que a atividade enzimática reduza 50% da sua atividade catalítica inicial quando submetida a uma determinada temperatura. Este é um parâmetro importante para a utilização de uma enzima a nível industrial, uma vez que, quanto maior seu valor, maior é a termoestabilidade enzimática. Os resultados cinéticos apresentados na Tabela 7 mostram que o  $t_{1/2}$  diminuiu progressivamente, atrelado ao aumento da taxa específica de primeira-ordem da inativação térmica da protease ( $k_d$ ), com o aumento gradativo da temperatura, o que significa que a desnaturação irreversível é cada vez mais expressiva. No presente trabalho, o menor valor de  $k_d$  foi obtido para a temperatura de  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $0,0513 \text{ h}^{-1}$ ) e o maior valor aos  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $0,7523 \text{ h}^{-1}$ ), com tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) de 13,51 e 0,92 horas, respectivamente. Castro et al. (2015), utilizaram farelo de trigo como substrato de fermentação para a produção de protease por *Aspergillus niger*, e obtiveram valor de  $t_{1/2} = 433,22 \text{ min.}$ , ou, 7,22 horas aos  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ . Já Wang et al. (2013) observaram um  $t_{1/2}$  máximo aos  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  de apenas 84,5 min.

para a protease produzida por *Aspergillus oryzae*. Portanto, a serina protease purificada no presente trabalho parece ser tão termoestável quanto, ou mais, que algumas proteases citadas na literatura.

O tempo de redução decimal (valor  $D$ ), definido como o tempo necessário para a redução de 90% na atividade enzimática inicial, corresponde a outro parâmetro que pode ser utilizado para averiguar a resistência da enzima à inativação térmica e fornecer informações essenciais para a utilização industrial. Pode ser observado na Tabela 7 que na temperatura de 45 °C a enzima apresentou boa estabilidade, uma vez que, são necessárias 44,89 horas para reduzir sua atividade a 10% do valor inicial.

O gráfico de Arrhenius (Figura 8) de  $\ln(k_d)$  vs  $1/T$  permitiu estimar uma energia de ativação para a desnaturação térmica ( $E_d$ ) de 139,34 kJ.mol<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0,9768$ ). Este valor é superior aos encontrados por Silva et al. (2017) que apresentaram uma  $E_d = 49,7$  kJ.mol<sup>-1</sup> para a protease presente no estrato bruto produzido pelo fungo *Aspergillus tamaritii* URM 4634 e  $E_d = 28,8$  kJ.mol<sup>-1</sup> para a sua forma purificada. E por Lima et al. (2011) que obtiveram uma  $E_d = 107,4$  kJ.mol<sup>-1</sup> para uma protease colagenolítica produzida pelo fungo *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622. Desta forma pode-se observar uma maior termoestabilidade da serina protease purificada estudada no presente trabalho. Além disso, pode-se perceber a partir destas comparações, que a variabilidade dos dados de  $E_d$  é muito grande, provavelmente devido a grandes diferenças na fonte e na pureza das enzimas juntamente com os substratos utilizados.

Além disso, a estabilidade de uma proteína em determinada temperatura corresponde ao resultado do equilíbrio entre forças estabilizadoras e desestabilizadoras, que são influenciadas por interação hidrofóbicas e eletrostáticas, ligação de hidrogênio e de disulfeto e pelo grau de dobramento da molécula (ORTEGA et al., 2004). Dessa forma, a investigação de parâmetros termodinâmicos como entalpia ( $\Delta H$ ), entropia ( $\Delta S$ ) e energia livre ( $\Delta G$ ) da serina protease purificada do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848 foi realizada para entender o comportamento desta molécula em diferentes condições. Os resultados estão apresentados na Tabela 7. O  $\Delta H$  é visto como uma medida do número de ligações não covalentes quebradas para a formação de um estado de transição para a inativação enzimática. Em geral, grandes valores de  $\Delta H$  estão associados a uma maior estabilidade da enzima (OLUSESAN et al., 2011; BATISTA et al., 2014). O  $\Delta H_d$  apresentou valor de 136,70 kJ.mol<sup>-1</sup> aos 45 °C e foi superior ao encontrado por Melikoglu, Lina e Webb (2013)

para protease sintetizada pelo fungo *Aspergillus awamori* que apresentou um  $\Delta H = 80,4 \text{ kJ.mol}^{-1}$  para a mesma temperatura. Já Souza et al. (2015), trabalharam com uma protease termofílica proveniente do *Aspergillus foetidus* e obtiveram valor de  $\Delta H_d = 311,39 \text{ kJ.mol}^{-1}$  aos  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ . Isto comprova que, quanto maior o  $\Delta H$ , maior a estabilidade térmica da enzima.

A extensão do processo de desnaturação térmica da enzima também depende da entropia de inativação ( $\Delta S_d$ ) que expressa a quantidade de energia por grau envolvida na transição de um estado nativo para um estado desnaturado. O  $\Delta S$  representa a variação na extensão da desordem local entre estado de transição e estado fundamental. Assim, um  $\Delta S$  mais elevado implica um aumento no número de moléculas de proteína no estado ativo de transição e um aumento na desordem que pode ser do sítio ativo da enzima ou da sua estrutura. Esta é a principal força motriz no processo de desnaturação por calor (MARANGONI, 2003; SINGH; CHHATPAR, 2011; MELIKOGLU; LINA; WEBB, 2013). Os valores de  $\Delta S_d$  foram positivos em todas as temperaturas que a serina protease do *Mucor guilliermondii* URM 5848 foi testada e variaram entre  $155,45 \text{ kJ.mol}^{-1}$  e  $160,25 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , o que sugere um maior estado de desordem no processo de transição. Valores positivos de  $\Delta S_d$  também foram apresentados por Castro et al., (2015) para a protease produzida por *Aspergillus niger* ( $222,47 \leq \Delta S_d \leq 227,58 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ) e por Souza et al. (2015) para a protease do *Aspergillus foetidus* ( $599,59 \leq \Delta S_d \leq 610,49 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ). Olusesan et al. (2011) indicam que, valores positivos para o  $\Delta S_d$  são encontrados se a taxa limitante da reação for o desdobramento da proteína, com resultados moderadamente altos para o  $\Delta H$  e menores para o  $\Delta G$ , estando de acordo com o presente trabalho.

A energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) é outro importante parâmetro termodinâmico, inclui ambas contribuições relatadas anteriormente (entalpia e entropia). Portanto, é considerada uma ferramenta mais precisa e confiável para avaliar a estabilidade de uma enzima. Quanto menor ou negativo for o seu valor mais espontâneo é o processo, ou seja, a enzima se torna menos estável e a desnaturação ocorre mais facilmente, sendo o inverso, verdadeiro (MARANGONI, 2003; GOHEL; SINGH, 2012). De forma consistente com os demais parâmetros já discutidos anteriormente, a serina protease purificada do *Mucor guilliermondii* URM 5848 apresentou valores positivos para a  $\Delta G_d$  (Tabela 7), que variaram entre  $83,85$  e  $85,94 \text{ kJ.mol}^{-1}$  na faixa de temperatura estudada. Valores semelhantes foram obtidos por Silva et al. (2017) para a protease purificada do *Aspergillus tamarisii* URM 4634 ( $91,8 \leq \Delta G_d \leq 98,0 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) e por

Hernández-Martínez et al. (2011) para a serina protease purificada do *Aspergillus fumigatus* ( $89,2 \leq \Delta G_d \leq 91,4$ ).

### 3.8. Prospecção peptídica por espectrometria de massa (MALDI-TOF)

A ferramenta utilizada para tentar identificar a serina protease purificada produzida pelo fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848 foi baseada na técnica de “peptide mass fingerprinting (PMF)” com espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF. A massa dos peptídeos digeridos com tripsina foi determinada e pesquisada em bancos de dados no “National Center for Biotechnology Information – NCBI”, mais especificamente no “The Universal Protein Resource (UniProt)”. Não houve combinação significativa (Score superior a 67) com proteases presentes neste banco de dados (Figura 9A). No entanto, a sequência obtida foi combinada com algumas proteínas de fungos da divisão Mucoromycota (Figura 9B), como por exemplo, uma proteína não caracterizada de *Parasitella parasitica* (Nº de acesso: A0A0B7NTF2, Massa: 162487, Score: 57, Matches: 48), uma metaloprotease de *Hesseltinella vesiculosa* (Nº de acesso: A0A1X2GVW0, Massa: 76713, Score: 55, Matches: 38). Além disso, a massa de peptídeos derivada da serina protease do *Mucor guilliermondii* URM 5848 também foi combinada com outras proteínas de fungos da mesma espécie como é o caso da DNA-helicase do *Mucor circinelloides* (Nº de acesso: A0A168I924, Massa: 80682, Score: 54, Matches: 38). Portanto, a falta de um proteoma adequado nos bancos de dados para a protease do fungo utilizado no presente trabalho e de resultados com confiança estatística, sugere que a serina protease produzida por *Mucor guilliermondii* URM 5848, pode se tratar de uma nova enzima.

## 4. CONCLUSÃO

A utilização de planejamento estatístico fatorial  $2^4$  para aumentar a produção da protease do fungo filamentoso *Mucor guilliermondii* URM 5848 se mostra uma ferramenta eficiente. A utilização de sistema FPLC para a purificação enzimática é eficiente para conseguir um alto grau de pureza da serina protease estudada no presente trabalho. A enzima é classificada como uma serina protease devido a inibição da sua atividade proteolítica após a exposição do seu sítio catalítico ao inibidor fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) específico de serina proteases. Esta enzima apresenta boa estabilidade térmica a temperaturas máximas de até 40°C e não há

grandes influências de atividade aos íons e substâncias orgânicas estudadas. Os parâmetros cinéticos mostram que esta serina protease apresenta boa eficiência em catalisar o substrato azocaseína e a termodinâmica revela que a enzima pode ser utilizada a nível industrial em temperaturas medianas. A partir dos resultados obtidos na análise de MALDI-TOF pode-se sugerir que esta serina protease pode ser uma enzima nova ainda não catalogada nos bancos de dados específicos.

## 5. REFERÊNCIAS

ABDEL-NABY, M. A.; AHMED, S. A.; WEHAIDY, H. R.; EL-MAHDY, S. A. Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of stabilized *Bacillus stearothermophilus* alkaline protease. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 265–271, 2017.

ARECES, L. B.; BONINO, M. B. J.; PARRY, M. A. A.; FRAILE, E. R.; FERNÁNDEZ, H. M.; CASCONO, O. Purification and characterization of a milk clotting protease from *Mucor bacilliformis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 37, p. 283-294, 1992.

BATISTA, K. A.; BATISTA, G. L. A.; ALVES, G. L.; FERNANDES, K. F. Extraction, partial purification and characterization of polyphenoloxidase from *Solanum lycocarpum* fruits. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 102, p. 211–217, 2014.

BENMRAD, M. O.; MOUJEHED, E.; ELHOUL, M. B.; JAOUADI, N. Z.; MECHRI, S.; REKIK, H.; KOURDALI, S.; HATTAB, M. E.; BADIS, A.; SAYADI, S.; BEJAR, S.; JAOUADI, B. A novel organic solvent- and detergent-stable serine alkaline protease from *Trametes cingulata* strain CTM10101. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 961–972, 2016.

BHUNIA, B.; BASAK, B.; MANDAL, T.; BHATTACHARYA, P.; DEY, A. Effect of pH and temperature on stability and kinetics of novel extracellular serine alkaline protease (70 kDa). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 54, p. 1– 8, 2013.

BHATTI, H. N.; RASHID, M. H.; ASGHER, M.; NAWAR, R.; KHALID, A. M.; PERVEEN, R. Chemical modification results in hyperactivation and thermostabilization of *Fusarium solani* glucoamylase. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 177-185, 2007.

BLANCO, A. S.; DURIVE, O. P.; PÉREZ, C. B.; MONTES, Z. D.; GUERRA, N. P. Simultaneous production of amylases and proteases by *Bacillus subtilis* in brewery wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, p.665–674, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CASTRO, R. J. S.; NISHIDE, T. G.; SATO, H. H. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 236–245, 2014.

CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; ALBERNAZ, J. R. M.; SOARES, M. H.; SATO, H. H. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 199–207, 2015.

DI SANTO, M. E.; LI, Q.; LOGAN, D. Purification and characterization of a developmentally regulated carboxypeptidase from *Mucor racemosus*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 447-455, 1992.

DIXON, M.; WEBB, E. C. Enzyme Kinetics, third ed. Academic Press, New York, 1979.

EGITO, A. S.; GIRARDET, J. M.; LAGUNA, L. E.; POIRSON, C.; MOLLÉ, D.; MICLO, L.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L. Milk – clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k- casein. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 816-825, 2007.

ELIAS, M.; WIECZOREK, G.; ROSENNE, S.; TAWFIK, D. S. The universality of enzymatic rate–temperature dependency. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, p. 1–7, 2014.

EYRING, H.; STEARN, A. E. The application of the theory of absolute reaction rates to proteins. **Chemical Reviews**, v. 24, p. 253–270, 1939.

GOHEL, S. D.; SINGH, S. P. Purification strategies, characteristics and thermodynamic analysis of a highly thermostable alkaline protease from asalt-tolerant alkaliphilic actinomycete, *Nocardiosis alba* OK-5. **Journal of Chromatography B**, v. 889–890, p. 61–68, 2012.

GREEN, B.; BEEZHOLD, D. H. Industrial fungal enzymes: an occupational allergen perspective. **Journal of Allergy**, v. 2011, p. 1-11, 2011.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; BERGMANN, C. W.; LOERA-CORRAL, O.; ROJO-DOMÍGUEZ, A.; HUERTA-OCHOA, S.; REGALADO GONZÁLEZ, C.; PARADO-BARRAGÁN, L. A. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2001–2006, 2011.

HSIAO, N. W.; CHEN, Y.; KUAN, Y. C.; LEE, Y. C.; LEE, S. K.; CHAN, H. H.; KAO, C. H. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 89–94, 2014.

INOKUMA, K.; TAKANO, M.; HOSHINO, K. Direct ethanol production from N-acetylglucosamine and chitin substrates by *Mucor* species. **Biochemical Engineering Journal**, v. 72, p. 24–32, 2013.

JAVED, M. R.; RASHID, M. H.; NADEEM, H.; RIAZ, M.; PERVEEN, R. Catalytic and thermodynamic characterization of endoglucanase (CMCase) from *Aspergillus oryzae* cmc-1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, p. 483-497, 2009.

KUMAR, S.; SHARMA, N. S.; SAHARAN, M. K.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1701–1705, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARIO, L. D.; CHAUD, L.; ALMEIDA, M. G.; CONVERTI, A.; DURÃES SETTE, L.; PESSOA, A. Production, purification, and characterization of an extracellular acid protease from the marine Antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. **Fungal Biology**, v. 119, p. 1129-1136, 2015.

LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; KELLN, R. A. The Relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 76, p. 103-122, 1973.

LIMA, C. A.; LIMA FILHO, J. L.; NETO, B. B.; CONVERTI, A.; CUNHA, M. G. C.; PORTO, A. L. F. Production and characterization of a collagenolytic serine proteinase by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: A Factorial study. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 549-560, 2011.

MARANGONI, A. G. Enzyme Kinetics: A Modern Approach, John Wiley & Sons, 2003.

MELIKOGLU, M.; LINA, C. S. K.; WEBB, C. Kinetic studies on the multi-enzyme solution produced via solid state fermentation of waste bread by *Aspergillus awamori*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 80, p. 76–82, 2013.

MORIN-SARDIN, S.; RIGALMA, K.; COROLLER, L.; JANY, J. L.; COTON, E. Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. **Food Microbiology**, v. 56, p. 69-79, 2016.

NASCIMENTO, T. C. E. S.; SENA, A. R.; GOMES, J. E. G.; SANTOS, W. L.; MONTALVO, G. S. A.; TAMBOURGI, E. B.; MEDEIROS, E. V.; SETTE, L. D.; PESSOA JUNIOR, A.; MOREIRA, K. A. Extracellular serine proteases by *Acremonium* sp. L1-4B isolated from Antarctica: Overproduction using cactuspear extract with response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 737–744, 2015.

NASCIMENTO, T. P.; SALES, A. E.; PORTO, C. S.; BRANDÃO, R. M. P.; TAKAKI, G. M. C.; TEIXEIRA, J. A. C.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F. Production and characterization of new fibrinolytic protease from *Mucor subullissimus* UCP 1262 in solid-state fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v. 3, p. 81-91, 2015.

NASCIMENTO, T. P.; SALES, A. E.; PORTO, C. S.; BRANDÃO, R. M. P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; TEIXEIRA, J. A. C.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F.; CONVERTI, A.

Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). **Journal of Chromatography B**, v. 1025, p. 16–24, 2016.

NASCIMENTO, T. P.; SALES, A. E.; PORTO, T. S.; COSTA, R. M. P. B.; BREYDO, L.; UVERSKY, V. N.; PORTO, A. L. F.; CONVERTI, A. Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, p. 1209–1219, 2017.

NEGI, S.; BANERJEE, R. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. **Food Research International**, v. 42, p. 443–448, 2009.

NOUANI, A.; BELHAMICHE, N.; SLAMANI, R.; BELBRAOUE, S.; FAZOUANE, F.; BELLAL, M. M. Extracellular protease from *Mucor pusillus*: purification and characterization. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, p. 112–117, 2009.

OLUSESAN, A. T.; AZURA, L. K.; FORGHANI, B.; BAKAR, F. A.; MOHAMED, A. K. S.; RADU, S.; MANAP, M. Y. A.; SAARI, N. Purification, characterization and thermal inactivation kinetics of a non-regioselective thermostable lipase from a genotypically identified extremophilic *Bacillus subtilis* NS 8. **New Biotechnology**, v. 28, p. 738–745, 2011.

ORTEGA, N.; DIEGO, S.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M. D. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chemistry**, v. 88, p. 209–217, 2004.

OSÓRIO, H.; REIS, C. A. Mass spectrometry methods for studying glycosylation in cancer. Rune Matthiesen (ed.), *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics*, **Methods in Molecular Biology**, v. 1007, p. 301–316, 2013.

PATEL, S. A critical review on serine protease: Key immune manipulator and pathology mediator. **Allergologia Et Immunopathologia**, v. 45, p. 579–591, 2017.

PAVLUKOVA, E. B.; BELOZERSKY, M. A.; DUNAEVSKY, Y. E. Extracellular proteolytic enzymes of filamentous fungi, **Biochemistry (Moscow)**, v. 63 p. 899–928, 1998.

POLGÁR, L. The catalytic triad of serine peptidases. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 2161–2172, 2005.

PREETHA, S.; BOOPATHY, R. Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 13, p. 573–578, 1997.

RIAZ, M.; PERVEEN, R.; JAVED, M. R.; NADEEN, H.; RASHID, M. H. Kinetic and thermodynamic properties of novel glucoamylase from *Humicola* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 558–564, 2007.

SALIHI, A.; ASOODEH A.; ALIABADIAN, M. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 827-835, 2017.

SAUTOUR, M.; MANSUR, C. S.; DIVIES, C.; BENSOUSSAN, M.; DANTIGNY, P. Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 28, p. 11 – 315, 2002.

SHIRASAKA, N.; NAITOU, M.; OKAMURA, K.; KUSUDA, M.; FUKUTA, Y.; TERASHITA, T. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK3. **Mycoscience**, v. 53, p. 354–364, 2012.

SILVA, O. S.; OLIVEIRA, R. L.; SILVA, J. C.; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Thermodynamic investigation of an alkaline protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: A comparative approach between crude extract and purified enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules (ARTICLE IN PRESS) xxx (2017) xxx–xxx**.

SINGH, A. K.; CHHATPAR, H. S. Purification, characterization and thermodynamics of antifungal protease from *Streptomyces* sp. A6. **Journal of Basic Microbiology**, v. 51, p. 424–432, 2011.

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

SOUZA, P. M.; WERNECK, G.; ALIAKBARIAN, B.; SIQUEIRA, F.; FILHO, E. X. F.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; MAGALHÃES, P. O.; PESSOA JÚNIOR, A. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 1103-1110, 2017.

SUN, Q.; CHEN, F.; GENG, F.; LUO, Y.; GONG, S.; JIANG, Z. A novel aspartic protease from *Rhizomucor miehei* expressed in *Pichia pastoris* and its application on meat tenderization and preparation of turtle peptides. **Food Chemistry**, v. 245, p. 570–577, 2018.

WANG, D.; ZHENG, Z. Y.; FENG, J.; ZHAN, X. B.; ZHANG, L. M.; WU, J. R.; LI, C. C.; ZHU, L. Influence of sodium chloride on thermal denaturation of a high- salt-tolerant neutral protease from *Aspergillus oryzae*. **Food Science Biotechnology**, v. 5, p. 1-7, 2013.

YADAV, S. K.; BISHT, D.; TIWARI, S.; DORMWAL, N. S. Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 667–677, 2015.

YEGIN, S.; FERNANDEZ-LAHORE, M.; SALGADO, A. J. G.; GUVENC, U.; GOKSUNGUR, Y.; TARIA, C. Aspartic proteínases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 89, p. 949–960, 2011.

YEGIN, S.; GOKSUNGUR, Y.; FERNANDEZ-LAHORE, M. Purification, structural characterization, and technological properties of an aspartyl proteínase from submerged cultures of *Mucor mucedo* DSM 809. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1312–1319, 2012.

ZANPHORLIN, L. M.; CABRAL, H.; ARANTES, E.; ASSIS, D.; JULIANO, L.; DA-SILVA, R.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2137–2143, 2011.

## TABELAS

**Tabela 1** – Matriz do planejamento fatorial completo  $2^4$  para analisar os fatores de influencia na produção de protease pelos fungos *Mucor guilliermondii* URM 5848.

Fatores	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Temperatura °C	35	40	45
Farelo de Trigo (g)	0,25	0,375	0,5
Farelo de Soja (g)	0,2	0,3	0,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g)	0,1	0,15	0,2

**Tabela 2** – Matriz do planejamento fatorial fracionado  $2^4$ , contendo quatro pontos centrais associados com a variável resposta atividade proteásica total do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848.

Ensaio	Temperatura (°C)	F. Trigo (g)	F. Soja (g)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g)	U.mL <sup>-1</sup>
1	35	0,25	0,2	0,1	8,066 <sup>c</sup> ±0,152
2	45	0,25	0,2	0,1	0,972 <sup>i</sup> ±0,045
3	35	0,5	0,2	0,1	7,315 <sup>d</sup> ±0,087
4	45	0,5	0,2	0,1	0,511 <sup>j</sup> ±0,036
5	35	0,25	0,4	0,1	3,610 <sup>g</sup> ±0,059
6	45	0,25	0,4	0,1	0,974 <sup>i</sup> ±0,066
7	35	0,5	0,4	0,1	3,153 <sup>h</sup> ±0,049
8	45	0,5	0,4	0,1	0,650 <sup>j</sup> ±0,066
<b>9</b>	<b>35</b>	<b>0,25</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>10,334<sup>a</sup>±0,073</b>
10	45	0,25	0,2	0,2	0,927 <sup>i</sup> ±0,035
11	35	0,5	0,2	0,2	9,332 <sup>b</sup> ±0,068
12	45	0,5	0,2	0,2	0,578 <sup>j</sup> ±0,028
13	35	0,25	0,4	0,2	5,750 <sup>e</sup> ±0,096
14	45	0,25	0,4	0,2	0,986 <sup>i</sup> ±0,055
15	35	0,5	0,4	0,2	5,013 <sup>f</sup> ±0,136
16	45	0,5	0,4	0,2	0,514 <sup>j</sup> ±0,030
17	40	0,375	0,3	0,15	3,696 <sup>g</sup> ±0,052
18	40	0,375	0,3	0,15	3,631 <sup>g</sup> ±0,022
19	40	0,375	0,3	0,15	3,640 <sup>g</sup> ±0,043
20	40	0,375	0,3	0,15	3,695 <sup>g</sup> ±0,034

**Tabela 3** – Análise de variância (ANOVA), para verificar a influência dos parâmetros utilizados no planejamento fatorial fracionado 2<sup>4</sup> sob a produção de protease pelo fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848.

FV	SQ	GL	QM	F-valor	p-valor
(1)Temperatura (°C)	134,6245	1	134,6245	131340,9	0,000000
(2)F.T.	1,2782	1	1,2782	1247,0	0,000050
(3)F.S.	18,7730	1	18,7730	18315,1	0,000001
(4)KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,1593	1	4,1593	4057,9	0,000009
1 by 2	0,1024	1	0,1024	99,9	0,002131
1 by 3	19,4089	1	19,4089	18935,5	0,000001
1 by 4	4,4100	1	4,4100	4302,4	0,000008
2 by 3	0,0163	1	0,0163	15,9	0,028172
2 by 4	0,0178	1	0,0178	17,3	0,025189
3 by 4	0,0107	1	0,0107	10,4	0,048304
Falta de Ajuste	0,0391	6	0,0065	6,4	0,078822
Erro Puro	0,0031	3	0,0010		
Total SQ	182,8432	19			

FV = Fontes de Variação; SQ = Soma dos Quadrados; GL = Graus de Liberdade; QM = Quadrado Médio. F.T. = Farelo de trigo; F.S. = Farelo de soja

**Tabela 4** – Etapas de purificação para a protease do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848.

URM 5848	U.mL <sup>-1</sup>	mg.mL <sup>-1</sup>	U.mg <sup>-1</sup>	mL	R. (%)	F. P.
Extrato Bruto	4,17	0,470	8,87	1,0	100	1
DEAE FF	2,14	0,071	30,14	1,0	51	3
Exclusão Molecular	1,77	0,005	354,00	1,0	42	40

U.mL<sup>-1</sup> = Atividade Proteásica Total; mg.mL<sup>-1</sup> = Proteína Total; U.mg<sup>-1</sup> = Atividade Específica; mL = Volume; R = Rendimento e F.P. = Fator de Purificação.

**Tabela 5** – Efeito de íons metálicos, compostos orgânicos e inibidores na atividade da protease purificada produzida pelo fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848.

Íons Metálicos	Atividade Residual (%) URM 5848	
	1 mM	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	94,44±1,40	96,56±0,95
MnCl <sub>2</sub>	112,07±1,83	116,22±1,57
MgCl <sub>2</sub>	94,06±1,40	99,81±3,15
FeCl <sub>3</sub>	100,19±3,39	89,52±2,58
CdCl <sub>2</sub>	93,87±1,40	88,36±2,51
HgCl <sub>2</sub>	59,19±1,29	41,60±1,12
AgNO <sub>3</sub>	86,01±1,79	81,11±0,84
CuCl <sub>2</sub>	90,04±1,37	74,62±1,33
CoCl <sub>2</sub>	59,96±1,79	47,52±1,13
KCl <sub>2</sub>	99,04±2,32	91,41±0,98

Compostos Orgânicos	Atividade Residual (%) URM 5848	
	0,10% (m/v)	0,25% (m/v)
Triton X-100	95,40±2,60	94,85±2,00
Tween-20	100,00±1,152	98,47±0,86
Tween-80	99,55±0,21	98,47±1,19
DMSO	95,98±2,04	98,09±0,64
SDS	95,21±1,81	66,79±0,67
β-Mercaptoetanol	51,72±2,27	54,96±1,75

Inibidores	Atividade Residual (%) URM 5848	
	0,5 mM	1 mM
EDTA	93,29±0,37	93,32±0,78
Pespstatina-A	87,69±1,43	88,85±0,84
PMSF	3,83±1,24	1,53±0,69
E-64	97,32±1,64	98,85±0,57

**Tabela 6** – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da serina protease produzida pelo fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848 em fermentação submersa utilizando farelo de soja e farelo de trigo como substratos.

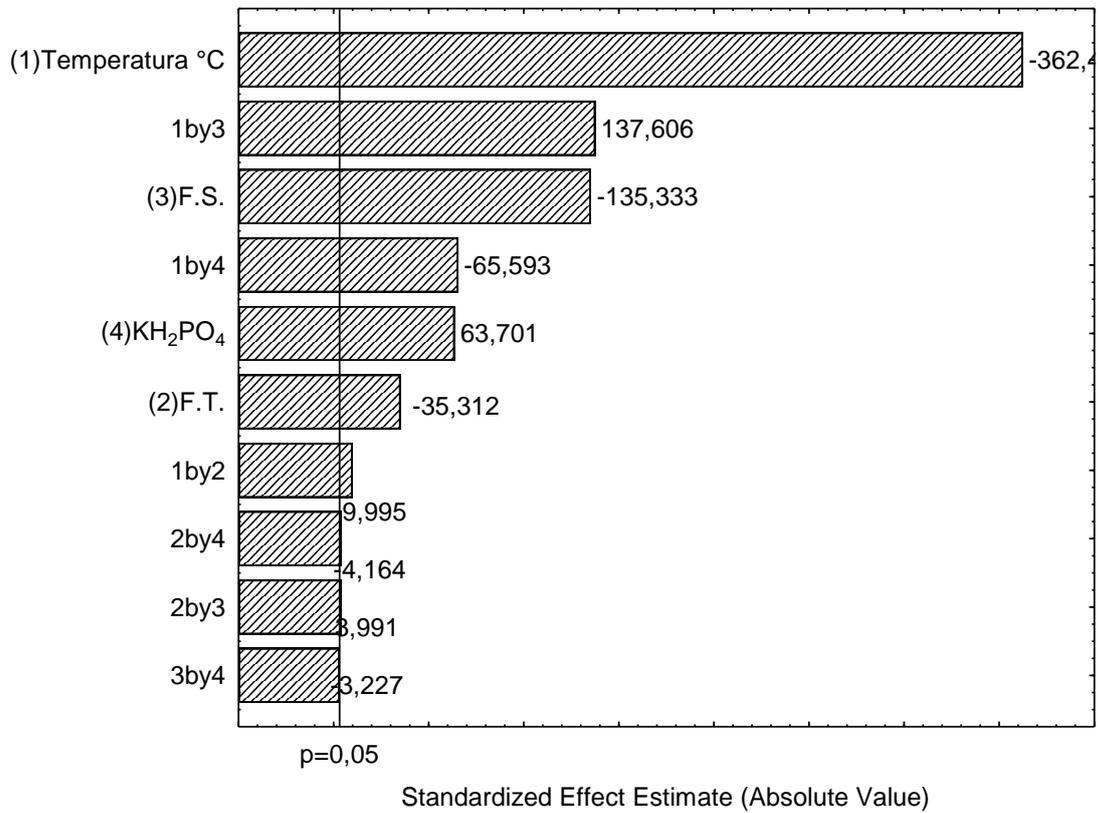
Parâmetros	<i>M. guilliermondii</i> URM 5848
$V_{max}$ (U.mg proteína <sup>-1</sup> )	250,00
$K_m$ (mg azocaseína.mL <sup>-1</sup> )	2,00
$K_{cat}$ (S <sup>-1</sup> )	320,51
$K_{cat}/K_m$ (S <sup>-1</sup> mg mL <sup>-1</sup> )	160,26
$E_a$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	19,91
$\Delta H^*$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	17,30
$\Delta G^*$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	61,79
$\Delta S^*$ (J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	-142,07
$\Delta G^*_{E-T}$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	-13,22
$\Delta G^*_{E-S}$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	1,80
$Q_{10}$	1,07

**Tabela 7** – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos de desnaturação térmica irreversível da serina protease purificada do *Mucor guilliermondii* URM 5848.

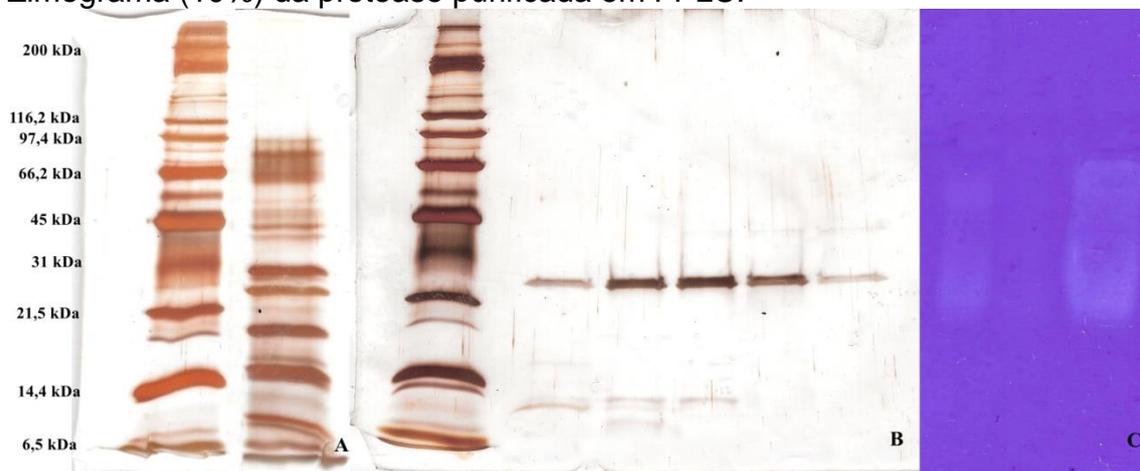
T (°C)	$k_d$ (h <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (h)	$D$ (h)	$R^2$	$\Delta H_d$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_d$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_d$ (J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	$E_d$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )
45	0,0513	13,51	44,89	0,9422	136,70	85,94	159,53	139,34
50	0,0945	7,33	24,37	0,9553	136,66	85,69	157,70	
55	0,2875	2,41	8,01	0,9816	136,61	84,03	160,25	
60	0,4931	1,41	4,67	0,942	136,57	83,85	158,24	
65	0,7523	0,92	3,06	0,9347	136,53	83,97	155,45	

## FIGURAS

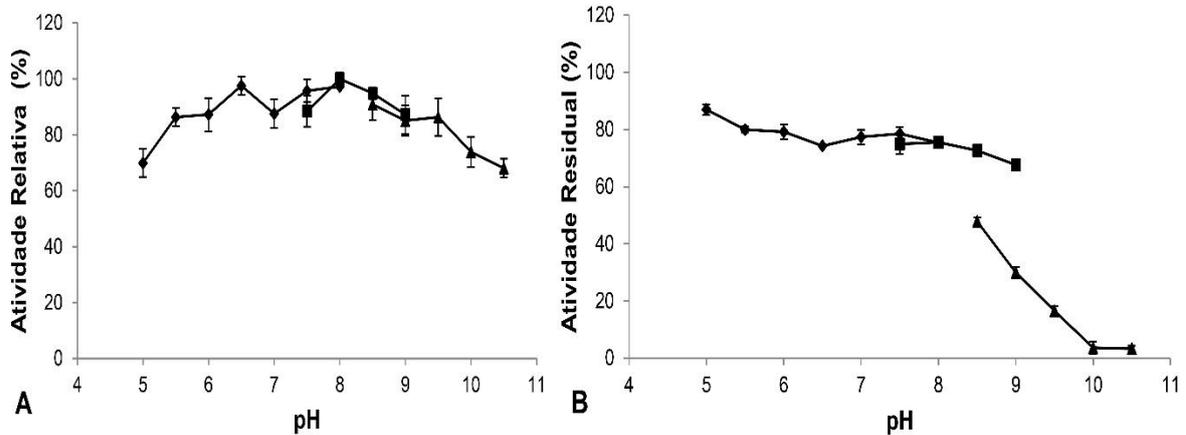
**Figura 1** – Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis independentes (Temperatura; Farelo de Trigo - F.T.; Farelo de Soja - F.S. e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) na produção de protease pelo fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848 de acordo com o planejamento fatorial completo  $2^4$ .



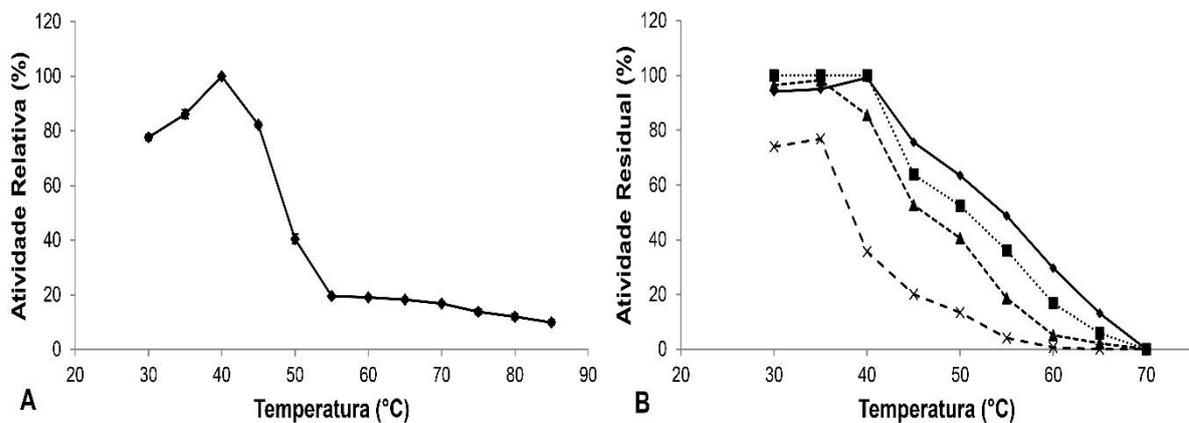
**Figura 2** – Determinação da massa molecular do extrato bruto e das frações purificadas por SDS-PAGE (10%) e zimograma, das proteínas do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848. (A). SDS-PAGE: Coluna 1, marcador molecular de proteína; Coluna 2, extrato bruto. (B). SDS-PAGE: Coluna 1, marcador molecular de proteína; Colunas 2 – 5, frações coletadas no FPLC utilizando coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) de exclusão molecular, com alto grau de pureza na Coluna 5. (C). Zimograma (10%) da protease purificada em FPLC.



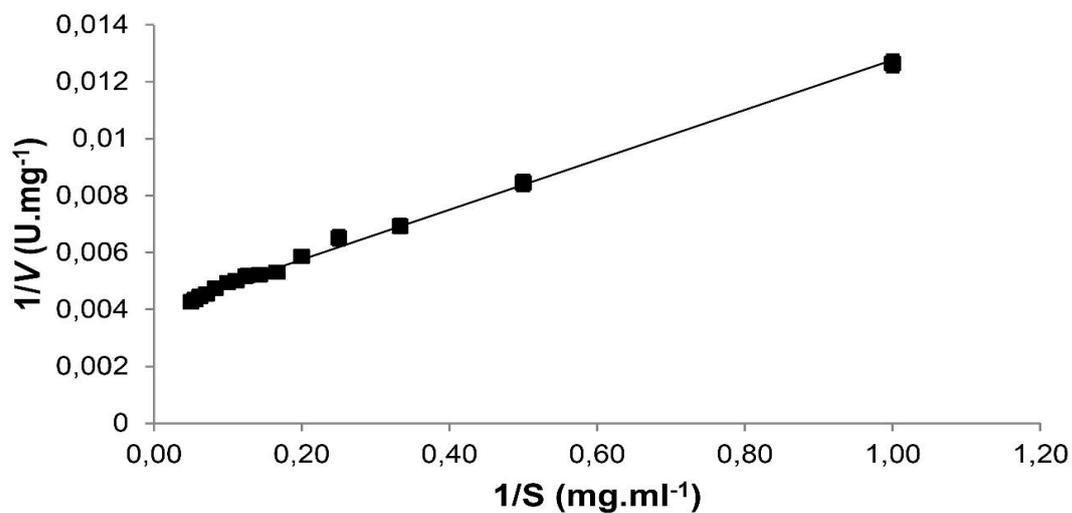
**Figura 3** – (A). pH ótimo da protease purificada produzida por fermentação submersa pelo *Mucor guilliermondii* URM 5848, nos tampões citrato – fosfato (◆), Tris – HCl (■) e carbonato – bicarbonato (▲). (B). Estabilidade ao pH da protease purificada, produzida por fermentação submersa pelo *Mucor guilliermondii* URM 5848, nos tampões citrato – fosfato (◆), Tris – HCl (■) e carbonato – bicarbonato (▲), após 24 horas de incubação.



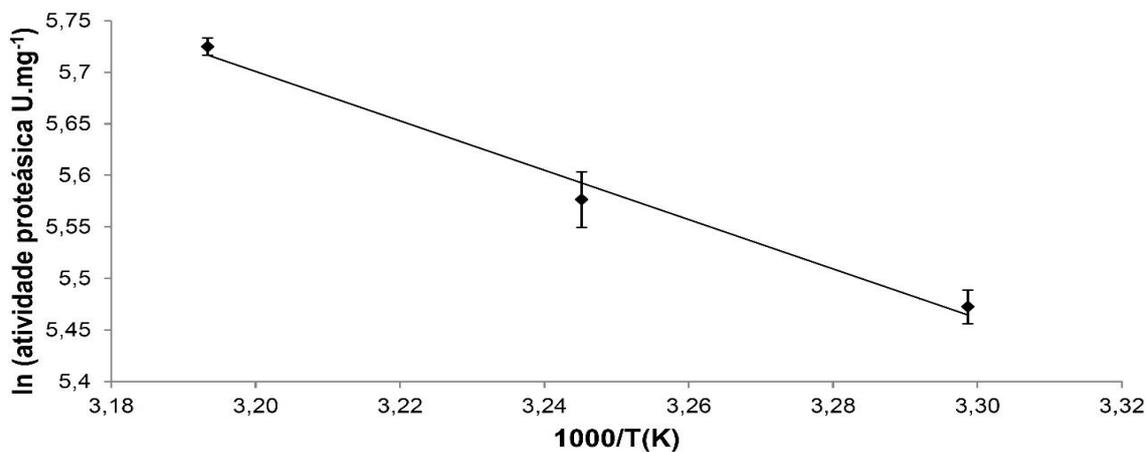
**Figura 4** – (A). Temperatura ótima da protease purificada, produzida por fermentação submersa pelo *Mucor guilliermondii* URM 5848. (B). Estabilidade térmica da protease purificada, produzida por fermentação submersa por *Mucor guilliermondii* URM 5848, durante 1 hora (◆); 2 horas (■); 8 horas (▲) e 24 horas (×).



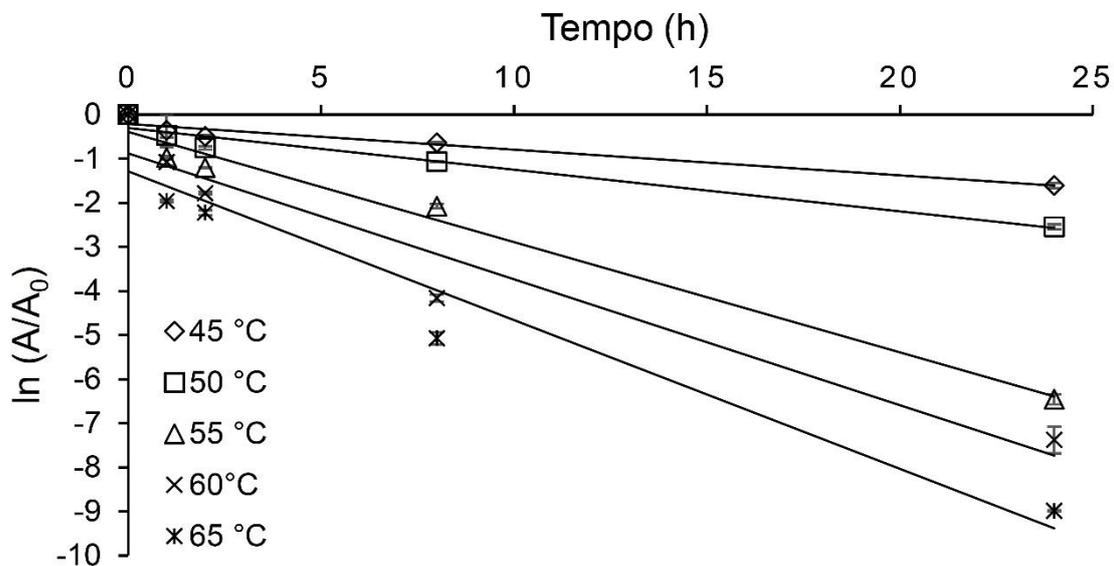
**Figura 5** – Gráfico do duplo recíproco (Lineweaver-Burk) da taxa inicial de hidrólise de azocaseína pela protease do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848 versus a concentração de azocaseína. As barras de erro representam o desvio padrão.



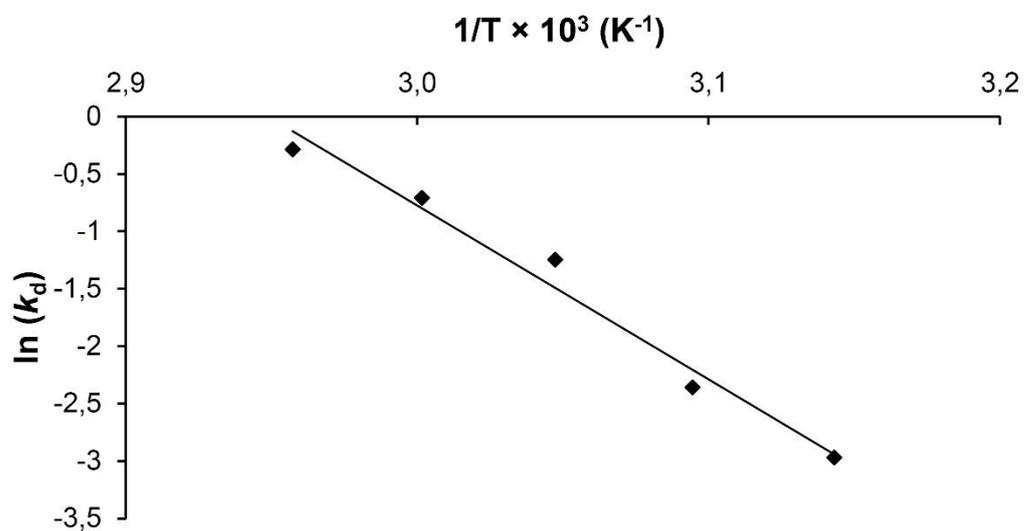
**Figura 6** – Gráfico de Arrhenius para a determinação da energia de ativação ( $E_a$ ) da serina protease purificada produzida pelo fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848.



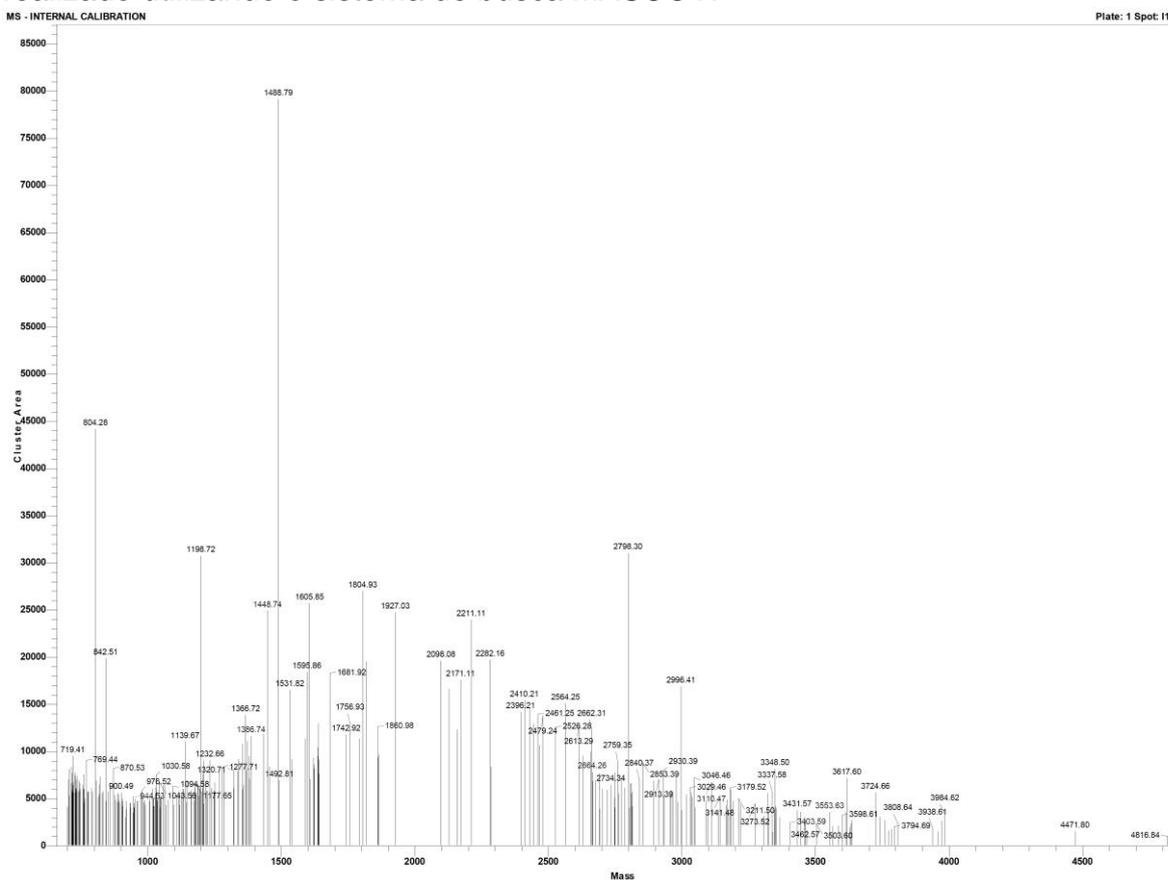
**Figura 7** – Gráfico de primeira-ordem da desnaturação térmica irreversível da serina protease purificada do *Mucor guilliermondii* URM 5848.



**Figura 8** – Gráfico de Arrhenius para calcular a energia de ativação ( $E_d$ ) da inativação/desnaturação térmica irreversível da serina protease purificada do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848.



**Figura 9 – (A).** Análise do espectro de massa MALDI-TOF da serina protease purificada produzida pelo *Mucor guilliermondii* URM 5848. O PMF da massa observada foi realizado utilizando o sistema de busca MASCOT.



**Figura 9 – (B).** Algumas proteínas correspondentes do banco de dado UniProt com a massa observada da serina protease purificada de *Mucor guilliermondii* URM 5848.

1. [A0A0B7NTF2](#) Mass: 162487 Score: 57 Expect: 0.61 Matches: 48  
Uncharacterized protein OS=Parasitella parasitica GN=PARPA\_12581.1 scaffold 45109 PE=4 SV=1
2. [A0A1X2GVW0](#) Mass: 76713 Score: 55 Expect: 1.1 Matches: 38  
ATP-dependent metalloproteinase Hfl OS=Hesseltinella vesiculosa GN=DM01DRAFT\_1403835 PE=4 SV=1
3. [A0A168I924](#) Mass: 80682 Score: 54 Expect: 1.2 Matches: 38  
DNA helicase OS=Mucor circinelloides f. lusitanicus CBS 277.49 GN=MUCCIDRAFT\_147282 PE=3 SV=1
4. [A0A0B7NVG6](#) Mass: 41953 Score: 54 Expect: 1.2 Matches: 12  
Uncharacterized protein OS=Parasitella parasitica GN=PARPA\_13617.1 scaffold 47020 PE=3 SV=1
5. [A0A168NP42](#) Mass: 42268 Score: 53 Expect: 1.5 Matches: 13  
Uncharacterized protein OS=Absidia glauca GN=ABSG\_L\_06658.1 scaffold 8661 PE=3 SV=1
6. [A0A0C9MRC6](#) Mass: 57927 Score: 52 Expect: 1.8 Matches: 25  
Peroxisomal-coenzyme A synthetase OS=Mucor ambiguus GN=MAM1\_0102d05298 PE=4 SV=1

## **CAPÍTULO V:**

**Prospecção de peptídeos multifuncionais por hidrólise da caseína caprina com protease do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133: Avaliação das atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-hipertensivas**

## **Prospecção de peptídeos multifuncionais por hidrólise da caseína caprina com protease do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133: Avaliação das atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-hipertensivas**

José Erick Galindo Gomes<sup>a</sup>, Maria Manuela Estevez Pintato<sup>b</sup>, Eleni Gomes<sup>a</sup>, Keila Aparecida Moreira<sup>c</sup>, Roberto da Silva<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE – UNESP – Rua Cristóvão Colombo 2265, São José do Rio Preto, São Paulo, CEP 15054-000, Brasil.

<sup>b</sup>Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa/Porto, Rua Arquiteto Lobão Vital, Apartado 2511, 4200 Porto, Portugal.

<sup>c</sup>Laboratório de Microbiologia, Tecnologia Enzimática e Bioprodutos – Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE - Avenida Bom Pastor, s/n.º, Garanhuns, Pernambuco, CEP 55292-278, Brasil

\*Autor de correspondência: [dasilva@ibilce.unesp.br](mailto:dasilva@ibilce.unesp.br)

**Resumo:** A hidrólise enzimática da caseína caprina com a protease purificada do fungo filamentoso *Mucor subtilissimus* URM 4133 foi realizada para obtenção de hidrolisados com massa molecular < 3 kDa e avaliação do potencial destes peptídeos nas atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-hipertensivas. O maior grau de hidrólise (GH) obtido a partir do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> foi de 46,02% no ensaio 7 (Enzima/Substrato = 1:5; 40 °C; 5 h). Já a avaliação do grau de hidrólise do ensaio 7 em função do tempo, revelou máximo de 64,19% após as 24 horas, entretanto, a avaliação das atividades biológicas apresentou melhores resultados para os hidrolisados no tempo de 12 horas (Enzima/Substrato = 1:5; 40 °C; GH - 59,95%), principalmente para a atividade anti-hipertensiva, que apresentou 92,57% de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA). Cinco frações (P1, P2, P3, P4 e P5) deste mesmo ensaio foram separadas por cromatografia de exclusão molecular em sistema FPLC, estas frações apresentaram diferentes níveis de atividades biológicas. Foram identificados por MALDI-TOF/TOF, em média 10 peptídeos para cada uma das frações (53 sequências), com algumas, inéditas.

**Palavras-chave:** leite de cabra, enzimas proteolíticas, peptídeos bioativos

## 1. INTRODUÇÃO

Diversas substâncias com propriedades bioativas são descritas junto com a sua funcionalidade na fisiologia do organismo entre elas têm-se os peptídeos biologicamente ativos, moléculas derivadas de proteínas complexas que podem desempenhar diversos benefícios e funcionalidades para a homeostase do organismo (UDENIGWE; ALUKO, 2012). Os principais efeitos fisiológicos atribuídos à estas moléculas, abrangem atividades do tipo imunomodulatória, anti-hipertensiva, antitrombótica, antimicrobiana, antioxidante e efeitos opióides (ARTEMOVA et al., 2010; DI BERNARDINI et al., 2011; ROJAS-RONQUILLO et al., 2012; CHALAMAIAH et al., 2014).

Outras atividades como potencial anti-inflamatório e atividade anticâncer também foram relatadas como responsáveis por efeitos auxiliares na manutenção da saúde dos consumidores (VO; RYU; KIM, 2013; UMayAPARVATHI et al., 2014). Diversos trabalhos já tratam dos estudos e benefícios associados a este tipo de molécula, como por exemplo, os gerados a partir de proteínas de leite e derivados (MADUREIRA et al., 2010; CHOI et al., 2012).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) provenientes da caseína são geralmente moléculas catiônicas que contém de 12 a 50 resíduos de aminoácidos e interagem com os fosfolipídios aniônicos da membrana microbiana, conferindo seletividade a estes peptídeos. Além da seletividade, a rara indução à resistência microbiana e a capacidade de sinergia com antibióticos convencionais tornam os PAMs atrativos, como agentes antimicrobianos (PALUMBO et al., 2010). Estas moléculas podem retardar o crescimento de bactérias e possuem um papel importante no sistema de defesa de muitas espécies animais (WU et al., 2013).

Já os peptídeos com atividades antioxidantes são capazes de inativar espécies reativas de oxigênio, eliminar os radicais livres, quelar metais, reduzir hidroperóxidos e eliminar oxidantes específicos dos alimentos. Estas moléculas são utilizadas como antioxidantes potencialmente multifuncionais, o que confere um aumento do valor nutricional das dietas (CASTRO; SATO, 2014).

Em geral, peptídeos antioxidantes derivados de alimentos apresentam massa molecular que varia entre 500-1800 Da e contém em sua maioria resíduos de valina ou leucina na extremidade N-terminal, que, por serem hidrofóbicos, se concentram na interface entre as camadas lipídicas e o conteúdo aquoso, o que facilita o acesso e a eliminação dos radicais livres (SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011).

Com relação aos peptídeos com capacidade de inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA), os medicamentos sintéticos como o captopril, enalapril e benazepril são vastamente utilizados para esta finalidade, entretanto, podem apresentar efeitos secundários, como reações alérgicas, erupções cutâneas e alterações do paladar. Portanto, é de fundamental interesse a descoberta de novas moléculas inibidoras da ECA que possam ser utilizadas de forma alternativa ou como coadjuvantes às drogas sintéticas (RAWENDRA et al., 2013).

Em geral, a maioria dos peptídeos que apresentam atividade inibidora da ECA possuem entre 2 e 12 aminoácidos, uma vez que estudos de cristalografia realizados por Natesh et al. (2003), demonstraram que o sítio ativo da enzima não é capaz de se acoplar a moléculas peptídicas grandes. Dessa forma, a intensidade da atividade anti-hipertensiva está diretamente relacionada à estrutura do peptídeo, ou seja, a sequência dos três primeiros aminoácidos presentes na porção C-terminal desempenha a principal resposta na ligação com o sítio ativo da ECA (HERNÁNDEZ-LEDESMA; CONTRERAS; RECIO, 2011).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as atividades biológicas de hidrolisados e peptídeos multifuncionais provenientes da caseína caprina a partir da hidrólise realizada por uma protease purificada sintetizada pelo fungo filamentoso *Mucor subtilissimus* URM 4133.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Obtenção do caseínato de sódio caprino**

O leite cru foi coletado de um rebanho leiteiro de cabras da raça Saanen e imediatamente armazenado a 4 °C. O processo de obtenção da caseína caprina, na forma de caseínato de sódio, ocorreu através da metodologia proposta por Egito et al. (2006), com modificações. Inicialmente, o leite foi desnatado por centrifugação (2100 x g por 30 min. a 32 °C) e a caseína total obtida mediante precipitação isoelétrica em pH 4,2 com HCl 1M. O precipitado foi separado por centrifugação a 2200 x g por 20 min., a 10 °C, lavado três vezes com água destilada e solubilizado em pH 7,0 através da adição de NaOH 1M. Esse ciclo de precipitação-lavagem-dissolução se repetiu por mais duas vezes. O precipitado de caseína, denominado de caseínato de sódio, foi dialisado contra água ultrapura a 4 °C, por 72h, posteriormente liofilizado e estocado a -20 °C.

## 2.2. Determinação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica da protease purificada produzida pelo fungo filamentosso *Mucor subtilissimus* URM 4133, foi monitorada de acordo com o método descrito por Leighton et al. (1973), com a utilização de azocaseína 1% (m/v), diluída em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,5, como substrato. Para a reação, 60 µL da enzima purificada foram adicionados a 100 µL do substrato e incubados na ausência de luz durante 1 hora. Posteriormente, 480 µL de ácido tricloroacético 10% (m/v) foi adicionado a mistura reacional e os ensaios centrifugados durante 5 minutos (3000 x g – 4 °C). Logo após, 320 µL do sobrenadante foram misturados a 560 µL de NaOH 1 M. A atividade enzimática foi definida como a variação de 0,01 na absorvância a 440 nm durante uma hora. As dosagens enzimáticas foram expressas em U.mL<sup>-1</sup>, e todos os ensaios realizados em triplicata.

## 2.3. Hidrólise da caseína caprina

A caseína caprina foi dissolvida para uma concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup> em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5, seguindo a metodologia proposta por Egito et al. (2007). Para a hidrólise da caseína foi utilizada a protease purificada produzida pelo fungo filamentosso *Mucor subtilissimus* URM 4133. Inicialmente, foi realizado planejamento fatorial 2<sup>3</sup> (Tabela 1), com o intuito de verificar as melhores condições de atuação da enzima para a degradação da caseína. Posteriormente, o ensaio que apresentou maior grau de hidrólise foi avaliado de forma a monitorar a hidrólise da caseína ao longo do tempo (1, 3, 5, 8, 12 e 24 horas) e só assim, verificar qual o tempo de hidrólise proporcionou a liberação de peptídeos com as melhores atividades biológicas. Após a realização de cada hidrólise, a reação enzimática foi interrompida por choque térmico e as amostras submetidas a banho fervente durante 10 minutos para a desnaturação das proteases.

## 2.4. Determinação do grau de hidrólise (GH)

O grau de hidrólise, definido como a quantidade de ligações peptídicas clivadas, ou o número de grupos amino formados durante o processo de hidrólise, foi determinado de acordo com a metodologia proposta por Adler-Nissen (1979), com o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Para a reação, 250 µL das amostras do hidrolisado de caseína, foram incubados com 2 mL de tampão fosfato de sódio, 0,2125 M, pH 8,2 e 2 mL do TNBS 0,1% (v/v) diluído em água ultra pura. A reação ocorreu a

50 °C durante 60 minutos. Transcorrido este período, foram adicionados 4 mL de HCl 0,1N para interromper a reação. A mistura reacional foi mantida em temperatura ambiente durante 30 minutos e posteriormente, analisada em espectrofotômetro a 340 nm. Para a curva de calibração a L-leucina foi utilizada como aminoácido padrão e as suas concentrações variaram entre 0,25 – 10 mM. O GH (%) foi calculado de acordo com a equação 1:

$$GH(\%) = \left( \frac{AN_2 - AN_1}{N_{pb}} \right) * 100 \quad (1)$$

AN<sub>1</sub> corresponde ao conteúdo de nitrogênio amino antes da hidrólise em mg.g<sup>-1</sup> de proteína, AN<sub>2</sub> corresponde ao conteúdo de nitrogênio amino depois da hidrólise em mg.g<sup>-1</sup> de proteína. E N<sub>pb</sub>, corresponde ao conteúdo total de nitrogênio amino presente contido nas ligações peptídicas do substrato proteico. Vale salientar que, os valores de AN<sub>1</sub> e AN<sub>2</sub> foram obtidos com base na curva padrão gerada com L-leucina, e N<sub>pb</sub>, de acordo com a metodologia de Micro-Kjeldahl (AOAC, 1990).

## 2.5. Eletroforese Tricina-SDS-PAGE dos hidrolisados

As amostras para a eletroforese foram preparadas com uma quantidade de 20 µL de cada solução dos hidrolisados e 480 µL de tampão de amostra (2x Sample Buffer – Sigma S3047), composto por tampão Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, 24% (v/v) de glicerol, 1% de dodecil sulfato de sódio, 4% (v/v) de β-mercaptoetanol e 0,02% de Coomassie Brilliant Blue G. Foi utilizado o marcador molecular (Ultra Low Range Molecular Weight Marker – Sigma M3546) composto por triosefosfato isomerase (26,600 Da); mioglobina (17,000 Da); α-lactalbumina (14,200 Da); aprotinina (6,500 Da); insulina B (3,496 Da) e bradicinina (1,060 Da). A eletroforese Tricina-SDS-PAGE dos hidrolisados e da caseína não hidrolisada transcorreu segundo Schägger e Jagow (1987), com algumas modificações. O gel de concentração foi composto por 4,9% de poliacrilamida (29:1) e o gel de corrida 15,4%. A corrida das amostras no gel foi realizada a 150 V durante 60 minutos.

Após a migração eletroforética o gel foi submetido ao processo de coloração. Inicialmente, foi utilizada uma solução fixadora com 40% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético, durante 30 minutos. O gel foi corado com uma solução que continha

10% (v/v) de ácido acético e 0,25 g (m/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250 durante 1 hora e descorado em uma solução de 10% (v/v) de ácido acético.

## 2.6. Determinação de proteína total

O Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) foi usado para a determinação da concentração de proteínas nos experimentos das atividades biológicas. Foi utilizado soroalbumina bovina como proteína padrão em concentrações que variaram entre 0 e 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

## 2.7. Avaliação das atividades biológicas dos hidrolisados

A avaliação das atividades biológicas dos hidrolisados ocorreu de duas formas distintas. Primeiro, os ensaios que hidrolisaram a caseína caprina em diferentes tempos (1, 3, 5, 8, 12 e 24 horas) foram centrifugados a 5000 x g a 4 °C e o sobrenadante utilizado para obtenção de um *pool* de peptídeos frações com massas moleculares menores que 3 kDa, com a utilização de Amicon Ultra-15 (Merck Millipore). Posteriormente, o ensaio que apresentou melhores resultados de atividade foi utilizado para o processo de purificação por exclusão molecular em sistema FPLC e posteriormente realizada uma nova avaliação do potencial de atividade das frações coletadas neste processo.

## 2.8. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das frações de peptídeos (< 3 kDa) foi realizada pelo método de turbidez descrito por Mine, Ma e Lauriau (2004) com modificações. Foram utilizadas as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Staphylococcus aureus* metilino-resistente (MRSA) (CCUG 60578), *Staphylococcus aureus* metilino-sensível (MSSA) (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (NCTC 2599) e *Listeria monocytogenes* (ESB 3572).

Para a determinação da atividade antimicrobiana, as colônias de bactérias foram ativadas em 10 mL de caldo triptona de soja (TSB) e incubadas a 37 °C durante 15 horas. A suspensão de cada bactéria foi inoculada em caldo TSB até atingir escala logarítmica de crescimento determinada por absorvância a 620 nm e padronizada uma quantidade de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Microplacas de 96 poços de fundo plano, de poliestireno e estéreis (Corning®), foram utilizadas para o ensaio. A mistura de 50  $\mu\text{L}$  (500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) das amostras com os peptídeos, 45  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller Hinton (CMH) e 5  $\mu\text{L}$  da

suspensão bacteriana foi realizada. O controle positivo apresentou apenas CMH e suspensão bacteriana. Já no controle negativo utilizou-se cloranfenicol na concentração de 300 µg.mL<sup>-1</sup>. Após a incubação das placas a 37 °C durante 24 horas procedeu-se a leitura com leitora de microplaca Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) a 620 nm.

## **2.9. Avaliação da atividade antioxidante total**

### **2.9.1. Atividade sequestradora de radicais ABTS<sup>+</sup> e DPPH**

A atividade sequestradora de radicais livres das frações de peptídeos foi determinada com o radical cátion ABTS<sup>+</sup>, gerado a partir do 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS) de acordo com Re et al. (1999) modificada. Para formação do radical ABTS<sup>+</sup>, persulfato de potássio e ABTS foram preparados a uma concentração final de 2,45 e 7 mM, respectivamente, e incubado ao abrigo da luz por 16 h à temperatura ambiente. A absorvância da solução do radical foi ajustada para 0,70 ± 0,02 a 734 nm, com espectrofotômetro, por diluição em tampão fosfato-salino 100 mM (PBS), pH 7,4. Para a reação, 50 µL (250 µg.mL<sup>-1</sup>) das amostras foram misturados com 950 µL da solução do radical ABTS<sup>+</sup>. Os ensaios foram incubados a 30 °C durante seis minutos e lidos a 734 nm, em triplicata. A curva padrão foi obtida com Trolox (1-500 µM) como substância antioxidante padrão. A atividade antioxidante (%) foi calculada em relação à atividade de eliminação do radical, de acordo com a seguinte equação 2:

$$Atividade\ antioxidante\ (\%) = \left( \frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde,  $A_{controle}$  representa à absorvância inicial do ABTS e  $A_{amostra}$  a absorvância após a adição da respectiva amostra com os peptídeos.

Outro radical livre utilizado para avaliar o potencial de atividade antioxidante foi o 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). A avaliação da atividade sequestradora do DPPH foi realizada segundo a metodologia descrita por Li et al. (2013), com algumas modificações. O radical DPPH (0,2 mM) foi preparado através de uma solução composta por 30% água e 70% etanol. Neste caso, 750 µL de amostra (250 µg.mL<sup>-1</sup>) foram misturados a 750 µL da solução que continha o radical DPPH. A reação ocorreu durante 30 minutos ao abrigo de luz e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a

517 nm. A curva padrão foi preparada com ácido ascórbico (1-100  $\mu\text{M}$ ) como antioxidante padrão. A atividade antioxidante (%) foi calculada através da mesma equação da metodologia de ABTS.

### **2.9.2. Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC)**

O teste de capacidade de absorção radical de oxigênio (ORAC) foi baseado pelo método proposto por Contreras et al. (2011). Resumidamente, a reação foi realizada a 40 °C em tampão fosfato-salino (PBS) 75 mM (pH 7,4) e a mistura de ensaio final (200  $\mu\text{L}$ ) continha fluoresceína (70 nM), 2,2-Azobis(2-metilpropionimidina) dihidroclorido – AAPH (14 mM) e o antioxidante padrão Trolox (0,2–1,6  $\text{nmol.mL}^{-1}$ ) ou amostra (em diferentes concentrações). A fluorescência foi registrada durante 137 minutos (104 ciclos) em leitor de placas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Offenburg, Alemanha) com a utilização de filtros de excitação de 485 nm e de emissão de 520 nm. O equipamento foi controlado pela versão do software FLUOstar Control (1.32 R2) para medição de fluorescência. Foram utilizadas microplacas de 96 poços de poliestireno preto (Nunc, Dinamarca). As soluções de AAPH e Trolox foram preparadas diariamente e a fluoresceína foi diluída a partir de uma solução de reserva (1,17 mM) em tampão fosfato-salino 75 mM (pH 7,4). Todas as misturas reacionais foram preparadas em duplicata e pelo menos três corridas independentes realizadas para cada amostra. Os valores finais de ORAC-FL foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox equivalente (TE).mg de proteína<sup>-1</sup>.

### **2.9.3. Atividade quelante de íons metálicos**

A atividade quelante de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) foi determinada de acordo com Saiga et al. (2003) com modificações propostas por Sánchez-Vioque et al. (2013). Para a reação, 0,5 mL (250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de amostra foi misturado com 2 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0 e 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuSO}_4$  5 mM. Após 30 min. de incubação em temperatura ambiente foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de pirocatecol violeta (PV) 4 mM. A mistura reacional foi homogeneizada e a reação continuada por mais 30 min., posteriormente, foi mensurada a 620 nm. Água deionizada foi utilizada como controle negativo, em substituição à amostra e uma solução de EDTA 0,045% utilizada como substância quelante padrão. A porcentagem de inibição de formação do complexo PV- $\text{Cu}^{2+}$  calculada da seguinte forma:  $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$ . Onde,  $A_0$  corresponde à absorvância do controle negativo, e  $A_1$  a absorvância das amostras.

A atividade quelante de ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Sánchez-Vioque et al. (2013). Para a reação, 0,5 mL ( $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de amostra foi misturado com 2 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,9 e 50  $\mu\text{L}$  de cloreto de ferro (II) 2 mM. Após 30 min. de incubação em temperatura ambiente foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de ferrozina 5 mM. A mistura reacional foi homogeneizada e a reação continuada por mais 30 min., posteriormente, mensurada a 562 nm. Água deionizada foi utilizada como controle negativo, em substituição à amostra e uma solução de EDTA 0,045% utilizada como substância quelante padrão. A porcentagem de inibição de formação do complexo ferrozina- $\text{Fe}^{2+}$  foi calculada da seguinte forma:  $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$ . Onde,  $A_0$  corresponde à absorvância do controle negativo, e  $A_1$  a absorvância das amostras.

### 2.10. Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA)

A atividade anti-hipertensiva foi realizada segundo a metodologia descrita por Holmquist et al. (1979) com modificações propostas por Asoodeh, Yazdi e Chamani (2012), com a utilização do N-[3-(2-Furil)acrilóil]-Phe-Gly-Gly (FAPGG) como substrato. Em cada teste das amostras o ensaio foi realizado com 22  $\mu\text{L}$  da ECA ( $50 \text{ mU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 50  $\mu\text{L}$  da amostra ( $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 100  $\mu\text{L}$  de FAPGG (0,5mM) e 150  $\mu\text{L}$  de tampão ECA (Tris-HCl 50mM, pH 7,5, 0,3 M de NaCl e 1 mM de  $\text{ZnCl}_2$ ). A mistura reacional foi incubada durante 60 min e a reação monitorada a cada 10 min. em leitora de microplaca Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) a 340 nm. A amostra controle foi feita substituindo a amostra por tampão ECA. Para o cálculo da atividade anti-hipertensiva (%), foi utilizada a equação 3:

$$\text{Inibição da ECA (\%)} = \left[ 1 - \left( \frac{\Delta A_{\text{inibidor}}}{\Delta A_{\text{controle}}} \right) \right] * 100 \quad (3)$$

O valor de  $\text{IC}_{50}$  da amostra que apresentou melhores resultados prévios foi definido como a concentração necessária para inibir 50% da atividade da ECA. Para isto, um total de cinco diferentes concentrações da amostra que continha os peptídeos inibidores foram utilizadas para avaliar a % de inibição da ECA. O  $\text{IC}_{50}$  foi obtido por regressão linear plotando a % de inibição contra as diferentes concentrações da amostra. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### **2.11. Avaliação do processo de digestão *in vitro* sob as atividades biológicas**

O ensaio de hidrólise em função do tempo (< 3 kDa) que apresentou melhores resultados para as atividades biológicas no geral, foi submetido ao processo de digestão *in vitro* com a finalidade de avaliar as atividades biológicas residuais e verificar dessa forma o comportamento e a resistência dos peptídeos frente as enzimas digestivas. Para isso, o ensaio de digestão *in vitro* foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Wang, Wang e Li (2016) com algumas modificações. Inicialmente, 10 mL da amostra (1 mg.mL<sup>-1</sup> de proteína) foram misturados com 12 mL da fase oral que continha 100 U.mL<sup>-1</sup> de  $\alpha$ -amilase porcina (Sigma- Aldrich) e CaCl<sub>2</sub> 1 mM com pH entre 5,6 – 6,9, durante 10 minutos a 37 °C, após este período, uma alíquota foi coletada. Em seguida, o pH foi ajustado para 2,0 com HCl 100 mM e adicionada pepsina porcina (Sigma- Aldrich) em uma proporção de enzima/substrato de 1:50. A mistura reacional foi incubada em banho-maria durante duas horas a 37 °C com agitação de 200 rpm. Neste período, duas alíquotas foram retiradas nos tempos de 60 e 120 minutos. Posteriormente, o pH foi ajustado para 5,3 com NaHCO<sub>3</sub> 0,9 M e, subsequentemente, ajustado para pH 7,5 com NaOH 2 M. A pancreatina foi adicionada ao ensaio na proporção enzima/substrato de 1:25 e a reação continuou por mais 2 horas a 37 °C em banho-maria com agitação constante de 200 rpm. Mais duas alíquotas foram retiradas nos tempos de 60 e 120 minutos. Todas as alíquotas foram submersas em banho fervente durante 10 minutos para a inativação das enzimas e passadas pelo processo de ultrafiltração por Amicon Ultra-15 (Merck Millipore) com membrana de corte < 3 kDa. Posteriormente, foram liofilizadas e ressuspendidas nas mesmas concentrações utilizadas para as atividades biológicas e armazenadas em -80 °C para análises posteriores.

### **2.12. Cromatografia de exclusão molecular**

A purificação parcial da amostra do ensaio com melhores resultados para as atividades biológicas foi realizada por meio da distribuição da massa molecular dos peptídeos presentes no *pool* de hidrolisados, através da cromatografia de exclusão molecular em sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography – ÄktaPurifier GE Healthcare) com coluna Superdex Peptide 10/300 GL acoplada. O sistema foi operado com uma taxa de fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> e utilizou-se como eluente o tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5. Foi injetado um volume de 0,5 mL por corrida e os picos

coletados para a realização das atividades biológicas. As corridas foram monitoradas com uma absorvância de 280 nm e duração de 75 minutos.

### **2.13. Análise por espectrometria de massa**

A identificação dos peptídeos foi realizada por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF (4800 Plus, SCIEX). Os picos coletados no FPLC foram enriquecidos e purificados por cromatografia em C18 de fase reversa (ZipTips, Millipore) seguindo as instruções do fabricante e eluídos na placa de amostra de MALDI com uma solução de eluição do ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico da matriz MALDI a 8 mg.mL<sup>-1</sup> em 50% de acetonitrila, 0,1% de ácido trifluoroacético e fosfato de amônio 6 mM. Os espectros de massa dos peptídeos foram adquiridos em modo reflector positivo na faixa de massa de m/z 700-5000. Os picos com maior intensidade foram selecionados para o sequenciamento peptídico por MS/MS. As proteínas foram identificadas pela abordagem Peptide Mass Fingerprint + MS/MS com o software Mascot (v2.5.1, Matrix Science) com a utilização do banco de dados de sequências de proteína UniProt para a seleção taxonômica Mucorales e Caprinae (versão 2017\_08). As configurações de pesquisa de proteínas foram a oxidação da metionina (modificação variável), zero clivagens perdidas e tolerância máxima de erro de 50 ppm (MS) e 0,5 Da (MS/MS). As pontuações de proteínas superiores a 67 foram consideradas significativas ( $p < 0,05$ ).

### **2.14. Análise estatística**

A análise estatística, teve como variável resposta o grau de hidrólise dos ensaios e foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA), obtida por meio do software Statistica 8.0, para verificar as variáveis com efeitos estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) e o ajuste do modelo aos dados experimentais. Nas demais análises utilizou-se como teste de comparação de médias o Teste de Tukey com nível de 5% de probabilidade, através do programa SPSS Statistics. Todos os ensaios foram realizados em ordem aleatória.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Grau de hidrólise (GH)**

O maior GH da caseína caprina hidrolisada pela protease do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133 para o planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>, ocorreu no ensaio

7 (46,02%±0,46), que apresentou diferença estatística entre os demais, como pode ser observado na Figura 1A, no qual a relação E/S foi de 1:5, a 40 °C durante 5 horas. A ANOVA (Tabela 2) demonstrou que, todas as variáveis e suas interações foram estatisticamente significativas. O ajuste do modelo foi medido pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) = 0,985 e  $R^2_{ajuste}$  = 0,967 e indicou que 98,5% da variação total do grau de hidrólise foi explicado pelo modelo estatístico. A variável tempo, apresentou a maior influência de efeito positivo no processo de hidrólise (Figura 2), dessa forma, quanto maior o tempo, maior o GH. As interações entre as variáveis independentes exerceram pouca influência no processo, mesmo que positivas.

O monitoramento do grau de hidrólise do ensaio 7 (Figura 1B) em função do tempo demonstrou que o maior GH da caseína caprina, ocorreu no ensaio de 24 horas (64,19%±0,90), entretanto, não houve diferença estatística entre os tempos de 12 horas (59,95%±0,81) e 24 horas. Isso indica que, após as 12 horas de hidrólise, a protease perdeu sua eficiência de catálise influenciada principalmente pela temperatura.

Smialowska, Matia-Merino e Carr (2017) hidrolisaram caseínato caprino a 37 °C com tripsina comercial e obtiveram grau de hidrólise de 26,3%±0,8 após 18 horas, a partir de uma concentração de 35 mg.mL<sup>-1</sup> de caseína e uma relação E/S de 1:200. Tagliacruzchi et al. (2017) utilizaram várias enzimas comerciais para a hidrólise de caseína dentro de um ensaio de digestão *in vitro* e apresentaram GH final de 82,7%±1,2 após 4 horas. Essas variações demonstram a influência direta de fatores como o tipo de enzima e sua proporção com relação ao substrato, além do tempo, no processo de degradação da caseína e conseqüentemente seu GH.

### **3.2. Eletroforese Tricina-SDS-PAGE**

Além da determinação do GH do caseínato caprino, o perfil de degradação protéica foi acompanhado pelo processo de eletroforese Tricina-SDS-PAGE. As diferentes condições de hidrólise em que a caseína foi submetida com relação à proporção de E/S, tempo e temperatura de hidrólise influenciou diretamente na atuação da protease frente ao substrato, com maior hidrólise e concentração de peptídeos de massas moleculares menores que 10 kDa principalmente no ensaio 7 (Figura 3A), o mesmo que apresentou o maior GH. A Figura 3B mostra a degradação da caseína em função do tempo, que foi mais acentuada a partir das 8 horas de hidrólise. Segundo Elzoghby, El-Fotoh e Elgindy (2011), a facilidade de clivagem da

caseína ocorre pelo fato desta proteína apresentar uma estrutura aberta devido à alta concentração dos resíduos de prolina, os quais dificultam a formação de uma grande quantidade de estruturas secundárias e terciárias, uma vez que os resíduos de prolina interrompem a formação de  $\alpha$ -hélice e folhas  $\beta$ , além de não haver pontes de dissulfeto na estrutura na caseína, o que às torna mais frágeis e mais susceptíveis ao ataque das proteases.

### 3.3. Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana frente a bactérias patogênicas mostrou que, o maior potencial de liberação de peptídeos com capacidade de inibir o crescimento destes micro-organismos, ou seja, com ação bacteriostática, ocorreu nos maiores tempos de hidrólise (Tabela 3). Os melhores resultados foram obtidos para as bactérias *Staphylococcus aureus* metilino-resistente (CCUG 60578), *Staphylococcus aureus* metilino-sensível (ATCC 25923), e *Listeria monocytogenes* (ESB 3572). Não foi constatado potencial de inibição para a *Escherichia coli* (ATCC 25922) na concentração utilizada neste estudo. Pode-se observar claramente o aumento da atividade em função do tempo, entretanto, não houve diferenças estatísticas entre os tempos 12 horas e 24 horas, isso está relacionado ou com a estabilização do GH, ou com a degradação de peptídeos devido ao elevado tempo de hidrólise, havendo perda de sua funcionalidade.

As frações menores que 3 kDa, separadas por cromatografia de exclusão molecular em FPLC, foram provenientes do ensaio de 12 horas. Um total de cinco frações foi avaliado para a atividade antibacteriana. A fração P4 apresentou melhores resultados de inibição (Tabela 4) e foi a única capaz de inibir o crescimento de *Bacillus cereus* (NCTC 2599) em 43,56% $\pm$ 0,80. Todas as frações apresentaram atividade contra as bactérias *Staphylococcus aureus* metilino-resistente (CCUG 60578), *Staphylococcus aureus* metilino-sensível (ATCC 25923), e *Listeria monocytogenes* (ESB 3572). Não houve potencial de inibição para nenhuma das frações contra o crescimento de *Escherichia coli* (ATCC 25922) na concentração utilizada, no entanto, três frações (P1, P3 e P5) apresentaram potencial de inibição para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145). Tang et al. (2015), trabalharam com hidrolisados de caseína por pepsina comercial e obtiveram resultados de inibição para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 com concentração de 15 mg.mL<sup>-1</sup>, e para o peptídeo purificado Cpep11, a concentração de inibição foi de 125  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. Já para a

*Escherichia coli* (ATCC 25922) os autores também não conseguiram inibição de crescimento no *pool* de hidrolisados. Aguilar-Toalá et al. (2017), obtiveram taxas de sobrevivência para as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Listeria innocua* 33090 de  $54,41\% \pm 2,87$ ,  $67,54\% \pm 2,12$  e  $72,76\% \pm 1,34$ , respectivamente no *pool* de hidrolisados < 3 kDa de caseína, obtidos a partir das proteases produzidas por *Lactobacillus plantarum*. Também foram obtidos resultados de inibição contra *Listeria monocytogenes* por hidrolisados de caseína caprina a partir de proteases do trato gastrointestinal (ALMAAS et al., 2008).

### 3.4. Atividade antioxidante

#### 3.4.1. Atividade sequestradora de radicais ABTS<sup>•+</sup> e DPPH

A avaliação da atividade sequestradora de radicais mostrou maior eficiência dos peptídeos na eliminação do radical livre ABTS<sup>•+</sup> em comparação ao DPPH no *pool* de hidrolisados em função do tempo (Figura 4A). O ensaio de 24 horas foi estatisticamente diferente dos demais, porém, após as oito horas de hidrólise a atividade antioxidante do ABTS<sup>•+</sup> foi superior aos 90%. Para a atividade de eliminação do radical DPPH, a variação no sequestro do radical ficou entre 26 e 32%, com algumas diferenças significativas entre os tempos. A atividade antioxidante equivalente ao trolox (EQT) e equivalente ao ácido ascórbico (EQAA) apresentada na Figura 4B, foi calculada de acordo com a curva padrão de cada atividade sequestradora de radicais livres e mostra uma EQT para o ABTS, superior a  $400 \mu\text{M} \cdot \text{mL}^{-1}$  logo após as 3 horas de hidrólise. Já a EQAA para o DPPH teve um valor máximo de  $29,69 \pm 0,56 \mu\text{M} \cdot \text{mL}^{-1}$  em uma curva com máxima de  $100 \mu\text{M} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Para as cinco frações < 3 kDa provenientes do ensaio de 12 horas, separadas no FPLC, a maior atividade ocorreu na fração P4 (Figura 4C) tanto na eliminação do ABTS<sup>•+</sup> ( $86,05\% \pm 0,075$ ), quando na do DPPH ( $67,13\% \pm 0,45$ ). As frações P2, P3 e P5 apresentaram atividade superior a 50% para o ABTS e a 40% para o DPPH. Com relação à atividade equivalente, os resultados acima de  $400 \mu\text{M} \cdot \text{mL}^{-1}$  de EQT foram observados nas frações P4 e P5 e para a EQAA as frações P3, P4 e P5 apresentaram o dobro de equivalência em comparação a análise dos hidrolisados em função do tempo, com equivalências de  $63,15 \pm 0,52 \mu\text{M} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $75,28 \pm 0,48 \mu\text{M} \cdot \text{mL}^{-1}$  e  $66,10 \pm 0,51 \mu\text{M} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectivamente (Figura 4D).

Li et al. (2013) utilizaram proteases comerciais para hidrólise de caseína caprina e observaram que os peptídeos apresentaram sensibilidade maior ao teste de

ABTS, em comparação aos teste com DPPH para a avaliação da atividade antioxidante. Chang et al. (2013), trabalharam com proteases de *Bifidobacterium longum* KACC 91563 e observaram que a atividade dos peptídeos hidrolisados da caseína apresentaram uma maior atividade antioxidante após 24 horas de hidrólise. De Gobba et al. (2014), trabalharam com hidrolisados de proteínas do leite caprino a partir de diferentes combinações de proteases e obtiveram atividade de eliminação do radical ABTS<sup>••</sup> acima de 80%. Além disso, as frações < 3 kDa separadas em FPLC e HPLC também apresentaram atividade superior aos 50%. Já Ahmed et al. (2015), observaram atividade de eliminação do radical DPPH a partir de peptídeos provenientes de proteínas do leite caprino, hidrolisadas com pepsina.

### **3.4.2. Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC)**

Neste método foi avaliada a capacidade de eliminação de moléculas oxidativas como os radicais peroxila, gerados pelo AAPH a partir da degradação oxidativa da fluoresceína. Esta reação foi mensurada como a área sob a curva de decaimento (AUC), conforme descrito por Ou et al. (2001). A capacidade de eliminação dos radicais peroxila aumentou ao longo do tempo de hidrólise (Figura 5A) assim como para a atividade do ABTS. Após as 8 horas de hidrólise, pode-se observar uma atividade superior a 2,0  $\mu\text{mol TE.mg de proteína}^{-1}$ , não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de 12 e 24 horas, com máxima atividade de  $2,91 \pm 0,04 \mu\text{mol TE.mg de proteína}^{-1}$ . Já para as frações separadas < 3 kDa, provenientes do ensaio de hidrólise de 12 horas, foi constatada maior capacidade de eliminação na amostra P3 (Figura 5B) que foi estatisticamente diferente das demais e apresentou atividade máxima de  $1,68 \pm 0,08 \mu\text{mol TE.mg de proteína}^{-1}$ . Estes resultados foram maiores que os encontrados por Moreno-Montoro et al. (2017) que trabalharam com peptídeos provenientes da hidrólise do leite de cabra fermentado e obtiveram atividade máxima entorno de  $1,0 \mu\text{mol TEAC.mg de proteína}^{-1}$  nas frações de peptídeos < 3 kDa. Assim como, Tavares et al. (2011), que trabalharam com hidrolisados de proteína do soro de leite, que obtiveram atividade máxima de  $1,061 \pm 0,07 \mu\text{mol TE.mg de proteína}^{-1}$ .

### **3.4.3. Atividade quelante de íons metálicos**

Os estudos da complexação de íons metálicos como  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  são realizados como mecanismos indiretos de atividade antioxidante, uma vez que, após a

complexação destes metais, as reações que envolvem a formação de radicais oxidativos são inibidas. Deste modo, o processo de oxidação é retardado. Como exemplo, a presença destes íons estimulam a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), como os radicais hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) formados pela reação de Fenton e no caso específico do  $\text{Fe}^{2+}$  pela reação de Haber-Weiss na presença de ânions superperóxidos (CANABADY-ROCHELLE et al., 2018).

Neste trabalho, foi obtida maior taxa de atividade quelante após as 24 horas de hidrólise (Tabela 5) tanto para o  $\text{Cu}^{2+}$  ( $59,61\% \pm 0,86$ ), quanto para o  $\text{Fe}^{2+}$  ( $75,33\% \pm 1,64$ ), com resultados que diferiram estatisticamente dos demais. Os tempos de hidrólise de 1 hora e 3 horas não apresentaram diferença estatística entre si, desta forma, não há influência do GH entre estes tempos para a atividade quelante de  $\text{Cu}^{2+}$ . Diferentemente do que ocorreu na atividade quelante de  $\text{Fe}^{2+}$ , que apresentou diferenças estatísticas entre todos os ensaios. A partir da análise das atividades de complexação das amostras < 3 kDa provenientes do ensaio de 12 horas (Tabela 5), foi possível constatar que a fração P4 foi estatisticamente diferente das demais e apresentou os maiores resultados de quelação para ambos os íons metálicos. Pode-se observar também que as amostras foram mais eficientes na atividade quelante de  $\text{Fe}^{2+}$  com todos os resultados acima dos 40%. Li e Zhao. (2011), avaliaram a eficiência da atividade quelante do  $\text{Fe}^{2+}$  em função da variação nas concentrações de  $\text{FeCl}_2$ , a partir de hidrolisados de caseína. Estes autores utilizaram o dobro da concentração final de proteína do presente trabalho, em sua reação e obtiveram atividade máxima de 65%. Ou seja, os peptídeos gerados na hidrólise da caseína caprina pela protease do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133, foram mais eficientes na complexação do  $\text{Fe}^{2+}$ .

### **3.5. Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA)**

Os testes de inibição da ECA por peptídeos gerados a partir da hidrólise do caseínato caprino através da protease utilizada no presente trabalho revelaram um grande potencial de atividade inibitória contra esta enzima, como apresentado na Figura 6A. A atividade aumentou com o passar do tempo de hidrólise até às 12 horas e apresentou máxima atividade de  $92,57\% \pm 0,63$ . Em 24 horas, o potencial de inibição caiu significativamente para  $46,85\% \pm 0,57$ , isto pode ter ocorrido devido à ação de degradação da protease nas sequências peptídicas com potencial de inibição. Estes resultados são maiores que os encontrados por Ibrahim, Ahmed e Miyata (2017), que

hidrolisaram a caseína caprina com pepsina comercial e obtiveram atividade de inibição contra a ECA em torno de 80% no *pool* de hidrolisados.

Todas as frações separadas do ensaio de 12 horas apresentaram resultados superiores aos 50%, com destaque para a fração P5 que desempenhou maior atividade de inibição da ECA ( $89,88\% \pm 0,78$ ) e diferiu estatisticamente das demais (Figura 6B). As frações P2 e P4 não foram diferentes entre si e apresentaram resultados de inibição de  $75,77\% \pm 1,51$  e  $78,57\% \pm 1,43$ , respectivamente. Na análise do  $IC_{50}$  das frações (Tabela 6), pode-se observar uma variação entre  $153,67 \pm 1,92 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (P3) e  $35,42 \pm 1,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (P5). Esta variação se encontra dentro do que é relatado na literatura. Tagliazucchi et al. (2016), estudaram o potencial de inibição da ECA das proteínas do leite caprino hidrolisadas a partir do processo de digestão *in vitro*, separaram 9 frações por HPCL e obtiveram  $IC_{50}$  entre  $1156,3 \pm 10,5$  e  $14,1 \pm 0,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Já Espejo-Carpio et al. (2016), avaliaram também a hidrólise de proteínas do leite caprino no processo de digestão *in vitro* a partir de diferentes combinações de proteases e observaram uma variação no  $IC_{50}$  entre  $399,8 \pm 15,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $212,0 \pm 12,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### **3.6. Avaliação do processo de digestão *in vitro* sob as atividades biológicas**

Após o processo de digestão *in vitro*, pode-se observar as atividades biológicas residuais do *pool* de peptídeos < 3 kDa, provenientes do ensaio de 12 horas, na Tabela 7. De forma geral, não houve alterações significativas entre a amostra não digerida (Tabela 3) e a saliva, conseqüentemente, pode-se constatar que a  $\alpha$ -amilase não apresentou efeitos sobre os peptídeos bioativos. Para a atividade antimicrobiana, esse processo foi capaz de gerar peptídeos que apresentaram uma pequena atividade de inibição contra *Escherichia coli* (ATCC 25922) após os 120 minutos de digestão gástrica, com um incremento dessa atividade ao passar do tempo da digestão intestinal. Já com relação as demais bactérias, a atividade de inibição não apresentou alterações consideráveis e permaneceu relativamente constante ao longo do tempo, ou seja, o ensaio de digestão gastrointestinal agiu de forma sinérgica e contribuiu com a ação dos peptídeos bioativos. O mesmo não ocorreu com Gough et al. (2017), que avaliaram a resistência da nisina, um dos peptídeos mais conhecidos com atividade antimicrobiana, frente ao processo de digestão gastrointestinal e observaram redução

dessa atividade principalmente no ensaio com pancreatina, com a constatação de que a nisina, apresenta maior degradação no intestino delgado.

Na avaliação da atividade antioxidante total pode-se concluir que o processo de digestão *in vitro* gerou alterações no perfil peptídico do *pool* de hidrolisados, entretanto, estas alterações foram positivas. Uma vez que, a capacidade dos peptídeos em sequestrar o radical ABTS<sup>•+</sup> não foi afetada e permaneceu acima dos 95% ao longo de todo ensaio, com atividade máxima de 97,67%±0,78. Dessa forma, não houve interferências significativas nem da saliva, nem das proteases presentes no trato gastrointestinal. Já para o radical DPPH, a pepsina foi responsável por um aumento considerável de 11,01% na atividade de sequestro deste radical após os 120 minutos, no entanto, esse incremento foi perdido com o passar do tempo da digestão intestinal e a atividade terminou menor que a inicial. O teste de ORAC revelou que a capacidade dos peptídeos em absorver radicais de oxigênio aumentou consideravelmente ao longo do tempo e passou de 2,85±0,05 para máxima atividade de 3,87±0,10 µmol TE.mg de proteína<sup>-1</sup>, após os 60 minutos da digestão intestinal.

O potencial quelante dos peptídeos frente aos íons metálicos Cu<sup>2+</sup> e Fe<sup>2+</sup> não foi afetado de forma significativa e as atividades variaram entre 43,75%±1,25 e 49,73%±0,74 para o Cu<sup>2+</sup> e para o Fe<sup>2+</sup> entre 58,24%±1,71 e 65,25%±1,32. Ao e Li (2013), avaliaram a estabilidade da atividade antioxidante de duas frações de peptídeos provenientes da hidrólise de caseína por uma protease comercial (alcalase) e observaram que uma das frações foi mais resistente, tanto para a atividade de sequestro do radical ABTS<sup>•+</sup>, quanto para atividade do ORAC, ao longo do tempo de hidrólise, mesmo assim, ao final do processo de digestão as frações apresentaram menor atividade antioxidante que a inicial, em ambas as análises.

A capacidade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) permaneceu acima dos 78% de atividade, mesmo com uma redução de 12,59% ao longo do ensaio de digestão. Isso mostrou que as proteases presentes no trato gastrointestinal foram capazes de degradar alguns peptídeos que agem contra a ECA, entretanto, o *pool* de peptídeos continuou eficiente para esta atividade e é capaz de agir no processo de controle da pressão arterial, caso estes peptídeos sejam absorvidos pelo organismo. Resultados semelhantes foram observados por Petrat-Melin et al. (2015), que avaliaram a resistência de frações peptídicas provenientes da hidrólise da caseína e obtiveram atividade inibitória da ECA em torno de 70% após 120 minutos de digestão.

### 3.7. Cromatografia de exclusão molecular

O procedimento de exclusão molecular do *pool* de peptídeos < 3 kDa provenientes do ensaio de 12 horas, em sistema FPLC, foi capaz de separar frações com picos bem definidos, portanto, a coluna utilizada apresentou uma alta resolução para a separação das moléculas de acordo com sua massa molar, como mostra a Figura 7A. Um total de cinco frações foi coletado (P1, P2, P3, P4 e P5) para a realização das atividades biológicas, bem como para o sequenciamento aminoacídico por espectrometria de massa em MALDI-TOF/TOF. Já na Figura 7B, pode-se observar as alterações geradas pelo processo de digestão *in vitro* no perfil peptídico deste mesmo *pool* de hidrolisados, com destaque para a degradação que ocorreu principalmente nos peptídeos com maior massa molecular, ou seja, aqueles que são eluídos primeiro.

### 3.8. Espectrometria de massa

Foram realizadas as análises por MALDI-TOF/TOF de todas as frações < 3 kDa, separadas em FPLC a partir do *pool* de hidrolisados de mesma massa molecular, obtidos no ensaio de 12 horas de hidrólise do caseínato caprino. A identificação da sequência de aminoácidos por PMF-MS/MS foi realizada com confiabilidade > 95% e levou em consideração os peptídeos mais predominantes, ou seja, com maior intensidade nos espectros de massa de cada fração. Um total de 53 peptídeos foram identificados para todas as frações, com uma média de 10 peptídeos para cada, como pode ser observado na Tabela 8. A busca pelas sequências no banco de dados BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>) revelou que a maioria das sequências ainda não foi relatada na literatura.

A composição, estrutura e grau de hidrofobicidade das sequências de peptídeos, levam às diferenças nas atividades biológicas e suas intensidades. As propriedades antioxidantes estão relacionadas principalmente com aminoácidos como Tyr (Y), Trp (W), Met (M), Lys (L), Cys (C) e His (H). Dessa forma, os aminoácidos com resíduos aromáticos podem atuar como doadores de prótons em radicais deficientes em elétrons, o que confere propriedades de eliminação de radicais, especialmente quando estão no terminal carboxila (Sarmadi e Ismail, 2010). Todos os peptídeos identificados apresentaram alguns destes aminoácidos em sua estrutura, com destaque para as frações P4 e P5, que possuem peptídeos mais ricos destes

aminoácidos em suas sequências, com resíduos aromáticos localizados principalmente no terminal carboxila.

Já para a atividade anti-hipertensiva, foi demonstrado que a inibição da ECA é mais eficaz quando há presença de aminoácidos como Tyr (Y), Phe (F), Trp (W), Pro (P), Ileu (I) e Val (V), além de resíduos de Leu (L), que aumentam significativamente o processo de inibição da ECA. Dados da literatura demonstram ainda que o potencial positivo de resíduos de Arg (R) e Lys (K) também contribuem para potencializar este efeito inibidor (HERNÁNDEZ-LEDESMA; CONTRERAS; RECIO, 2011). Vale salientar que, foram identificadas várias sequências com estes resíduos de aminoácidos em sua composição, o que provavelmente conferiu os resultados expressivos de inibição da ECA obtidos no presente trabalho.

#### 4. CONCLUSÃO

A utilização de planejamento estatístico fatorial  $2^3$  é eficiente para avaliar a forma com que os parâmetros testados influenciam na hidrólise da caseína caprina pela serina protease produzida pelo fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133, o que acarreta em um aumento considerável no GH. Os peptídeos liberados apresentam potencial para todas as atividades biológicas avaliadas, com destaque para as atividades antioxidantes e principalmente anti-hipertensiva. Os testes de digestão *in vitro* proporcionam um melhor entendimento sobre a resistência destes peptídeos frente às enzimas proteolíticas presentes no trato gastro intestinal. A identificação da sequência aminoacídica por espectrometria de massas permite a identificação confiável dos peptídeos, muitos deles ainda não catalogados nos bancos de dados específicos.

#### 5. REFERÊNCIAS

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, p. 1256-1262, 1979.

AGUILAR-TOALÁ, J. E.; SANTIAGO-LÓPEZ, L.; PERES, C. M.; PERES, C.; GARCIA, H. S.; VALLEJO-CORDOBA, B.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 65-75, 2017.

AHMED, A. S.; EL-BASSIONY, T.; ELMALT, L. M.; IBRAHIM H. R. Identification of potente antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. **Food Research International**, v. 74, p. 80-88, 2015.

ALMAAS, H.; BERNER, V.; HOLM, H.; LANGSRUD, T.; VEGARUD, G. E. Degradation of whey from caprine milk by human proteolytic enzymes, and the resulting antibacterial effect against *Listeria monocytogenes*. **Small Ruminant Research**, v. 79, p. 11-15, 2008.

AO, J.; LI, B. Stability and antioxidative activities of casein peptide fractions during simulated gastrointestinal digestion *in vitro*: Charge properties of peptides affect digestive stability. **Food Research International**, v. 52, p. 334-341, 2013.

ARTEMOVA, N. V.; BUMAGINA, Z. M.; KASAKOV, A. S.; SHUBIN, V. V.; GURVITS, B. Y. Opioid peptides derived from food proteins suppress aggregation and promote reactivation of partly unfolded stressed proteins. **Peptides**, v. 31, p. 332–338, 2010.

ASOODEH, A.; YAZDI, M. M.; CHAMANI, J. Purification and characterisation of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from lysozyme hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 131, p. 291–295, 2012.

CANABADY-ROCHELLE, L. L. S.; SELMECZI, K.; COLLIN, S.; PASC, A.; MUHR, L.; BOSCHI-MULLER, S. SPR screening of metal chelating peptides in a hydrolysate for their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 239, p. 478-485, 2018.

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

CHALAMAIAH, M.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYAI, T.; DIWAN, P. V.; KUMAR, P. U.; NIMGULKAR, C.; KUMAR, B. D. Immunomodulatory effects of protein hydrolysates from rohu (*Labeo rohita*) egg (roe) in BALB/c mice. **Food Research International**, v. 62, p. 1054–1061, 2014.

CHANG, O. K.; SEOL, K. H.; JEONG, S. G.; OH, M. H.; PARK, B. Y.; PERRIN, C.; HAM, J. S. Casein hydrolysis by *Bifidobacterium longum* KACC 91563 and antioxidant activities of peptides derived there from. **Journal Dairy of Science**, v. 96, p. 1–12, 2013.

CHOI, J.; SABIKHI, L.; HASSAN, A.; ANAND, S. Bioactive peptides in dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, p. 1-12, 2012.

CONTRERAS, M. D. M.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, L.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; RECIO, I. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 9–15, 2011.

DE GOBBA, C.; ESPEJO-CARPIO, F. J.; SKIBSTED, L. H.; OTTE, J. Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolysed by two commercial proteases. **International Dairy Journal**, v. 39, p. 28-40, 2014.

DI BERNARDINI, R.; HARNEDY, P.; BOLTON, D.; KERRY, J.; O'NEILL, E.; MULLEN, A. M.; HAYES, M. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1296–1307, 2011.

EGITO, A. S.; GIRARDET, J. M.; LAGUNA, L. E.; POIRSON, C.; MOLLÉ, D.; MICLO, L.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L. Milk – clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k- casein. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 816-825, 2007.

EGITO, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; LAGUNA, L. E.; MICLO, L.; GIRARDET, J. M.; GAILLARD, J. L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, p. 932-939, 2006.

ELZOGHBY, A. O.; EL-FOTOH, W. S. A.; ELGINDY, N. A. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 153, p. 206–216, 2011.

ESPEJO-CARPIO, F. J.; GARCÍA-MORENO, P. J.; PEREZ-GALVEZ, R.; MORALES-MEDINA, R.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M. Effect of digestive enzymes on the bioactive properties of goat milk protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v. 54, p. 21-28, 2016.

GOUGH, R.; O'CONNOR, P. M.; REA, M. C.; GOMEZ-SALA, B.; MIAO, S.; HILL, C.; BRODKORB, A. Simulated gastrointestinal digestion of nisin and interaction between nisin and bile. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, p. 530-537, 2017.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; CONTRERAS, M. D. M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, n. 1, p. 23–35, 2011.

IBRAHIM, H. R.; AHMED, A. S.; MIYATA, T. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. **Journal of Advanced Research**, v. 8, p. 63-71, 2017.

LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; KELLN, R. A. The Relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 76, p. 103-122, 1973.

LI, D.; ZHAO, X. H., Glutaminase-induced deamidation and hydrolysis of casein and metal-chelating or ACE-inhibitory activity of the hydrolysates *in vitro*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 324–332, 2011.

LI, Z.; JIANG, A.; YUE, T.; WANG, J.; SU, J. Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hidrolisates. **Jounal Dairy of Science**. v. 96, p. 4242-4251, 2013.

MADUREIRA, A. R.; TAVARES, T.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. *Invited review: Physiological properties of bioactivepeptides obtained from whey proteins.* **Journal Dairy of Science**, v. 93, p. 437–455, 2010.

MINE, Y.; MA, F.; LAURIAU, S. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1088-1094, 2004.

MORENO-MONTORO, M.; OLALLA-HERRERA, M.; RUFÍAN-HENARES, J. A.; MARTÍNEZ, R. G.; MIRALLES, B.; BERGILLOS, T.; NAVARRO-ALARCÓN, M.; JAUREGI, P. Antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial activity of fermented goat milk: activity and physicochemical property relationship of the peptide componentes. **Food & Function**, v. 8, n. 8, p. 2783-2791, ago. 2017.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

PALUMBO, D.; IANNACCONE, M.; PORTA, A.; CAPPARELLI, R. Experimental antibacterial therapy with puriindolines, lactoferrin and lysozyme in *Listeria monocytogenes*-infected mice. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 538-545, 2010.

PETRAT-MELIN, B.; ANDERSEN, P.; RASMUSSEN, J. T.; POULSEN, N. A.; LARSEN, L. B.; YOUNG, J. F. *In vitro* digestion of purified  $\beta$ -casein variants A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, B, and I: effects on antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory capacity. **Journal Dairy of Science**, v. 98, p. 15-26, 2015.

RAWENDRA, R. D. S.; AISHA; CHANG, C. I.; AULANNI'AM; CHEN, H. H.; HUANG, T. C.; HSU, J. L. A novel angiotensin converting enzyme inhibitory peptide derived from proteolytic digest of chinese soft-shelled turtleegg white proteins. **Journal of Proteomics**, v. 94, p. 359–369, 2013.

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

ROJAS-RONQUILLO, R.; CRUZ-GUERRERO, A.; FLORES-NÁJERA, A.; RODRÍGUEZ-SERRANO, G.; GÓMEZ-RUIZ, L.; REYES-GRAJEDA, J. P.; JIMÉNEZ-GUZMÁN, J.; GARCÍA-GARIBAY, M. G. G. Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. **International Dairy Journal**, v. 26, p. 147–154, 2012.

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, n. 4, p. 229–254, 2011.

SÁNCHEZ-VIOQUE, R.; POLISSIOU, M.; ASTRAKA, K.; MOZOS-PASCUAL, M.; TARANTILIS, P.; HERRAIZ-PEÑALVER, D.; SANTANA-MÉRIDAS, O. Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 150-159, 2013.

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

SCHÄGGER, H.; JAGOW, G. V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p. 368-379, 1987.

SMIALOWSKA, A.; MATIA-MERINO, L.; CARR, A. J. Assessing the iron chelation capacity of goat casein digest isolates. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 2553-2563, 2017.

TAGLIAZUCCHI, D.; SHAMSIA, S.; HELAL, A.; CONTE, A. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from goats' milk released by *in vitro* gastro-intestinal digestion. **International Dairy Journal**, v. 71, p. 6-16, 2017.

TANG, W.; YUAN, H.; ZHANG, H.; WANG, L.; QIAN, H.; QI, X. An antimicrobial peptide screened from casein hydrolyzate by *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane affinity method. **Food Control**, v. 50, p. 413-422, 2015.

TAVARES, T. G.; CONTRERAS, M. M.; AMORIM, M.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; PINTADO, M. E.; RECIO, I.; MALCATA, F. X. Optimisation, by response surface methodology, of degree of hydrolysis and antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolysates obtained with cardoon extract. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 926-933, 2011.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 11-24, 2012.

UMAYAPARVATHI, S.; MEENAKSHI, S.; VIMALRAJ, V.; ARUMUGAM, M.; SIVAGAMI, G.; BALASUBRAMANIAN, T. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostreacucullata*). **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 343-353, 2014.

VO, T. S.; RYU, B.; KIM, S. K. Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalga *Spirulina maxima*. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1336-1346, 2013.

WANG, C.; WANG, B.; LI, B. Bioavailability of peptides from casein hydrolysate *in vitro*: Amino acid compositions of peptides affect the antioxidant efficacy and resistance to intestinal peptidases. **Food Research International**, v. 81, p. 188-196, 2016.

WU, S.; QI, W.; LI, T.; LU, D.; SU, R.; HE, Z. Simultaneous production of multi functional peptides by pancreatic hydrolysis of bovine casein in an enzymatic membrane reactor via combinational chromatography. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2944-2951, 2013.

## TABELAS

**Tabela 1** – Matriz do planejamento fatorial  $2^3$  para analisar os fatores de influência no grau de hidrólise (GH) da caseína caprina por protease purificada do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133

Fatores	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Relação E/S	1:15	1:10	1:5
Temperatura (°C)	30	35	40
Tempo (h)	1	3	5

**Tabela 2** – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133 de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ .

FV	SQ	GL	QM	F-valor	p-valor
(1)Relação E/S	189,654	1	189,6543	3295,98	0,000012
(2)Temperatura (°C)	47,580	1	47,5801	826,89	0,000092
(3)Tempo (h)	857,758	1	857,7582	14906,89	0,000001
1 by 2	6,252	1	6,2515	108,64	0,001885
1 by 3	7,434	1	7,4336	129,19	0,001461
2 by 3	5,699	1	5,6989	99,04	0,002159
Falta de Ajuste	16,711	2	8,3553	145,21	0,001034
Erro Puro	0,173	3	0,0575		
Total SQ	1131,260	11			

FV = Fontes de Variação; SQ = Soma dos Quadrados; GL = Graus de Liberdade; QM = Quadrado Médio.

**Tabela 3** – Atividade antimicrobiana em %, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina, em função do tempo. Concentração de 500 µg.mL<sup>-1</sup>.

Micro-organismo	Tempo (horas)					
	1	3	5	8	12	24
<i>S. aureus</i> MR	10,3±1,4 <sup>e</sup>	28,7±2,6 <sup>d</sup>	35,9±1,8 <sup>c</sup>	49,19±1,8 <sup>b</sup>	62,3±2,7 <sup>a</sup>	67,3±2,2 <sup>a</sup>
<i>S. aureus</i> MS	14,9±2,6 <sup>e</sup>	25,7±1,7 <sup>d</sup>	37,1±3,1 <sup>c</sup>	52,64±2,2 <sup>b</sup>	65,1±1,2 <sup>a</sup>	66,6±2,5 <sup>a</sup>
<i>B. cereus</i>	-	-	13,8±2,6 <sup>b</sup>	18,27±3,1 <sup>b</sup>	29,6±2,3 <sup>a</sup>	25,9±1,1 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	11,3±2,1 <sup>d</sup>	18,4±1,6 <sup>c</sup>	25,61±1,2 <sup>b</sup>	37,8±2,4 <sup>a</sup>	28,3±2,5 <sup>b</sup>
<i>L.monocytogenes</i>	7,3±1,6 <sup>d</sup>	18,4±2,3 <sup>c</sup>	22,7±1,9 <sup>c</sup>	32,98±1,4 <sup>b</sup>	45,8±2,0 <sup>a</sup>	47,5±1,3 <sup>a</sup>

MR: metilino-resistente. MS: metilino-sensível.

**Tabela 4** – Atividade antimicrobiana em %, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise. Concentração de 500 µg.mL<sup>-1</sup>.

Micro-organismo	Frações				
	P1	P2	P3	P4	P5
<i>S. aureus</i> MR	60,86±4,10	37,29±3,49	35,21±2,77	86,73±1,53	59,68±2,44
<i>S. aureus</i> MS	55,95±3,27	30,88±1,37	35,72±3,13	86,04±1,64	43,83±1,51
<i>B. cereus</i>	-	-	-	43,56±0,80	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	15,91±1,04	-	23,96±0,95	-	18,73±0,43
<i>L. monocytogenes</i>	15,42±0,46	51,24±1,39	39,34±1,08	54,14±2,42	35,81±1,41

MR: metilino-resistente. MR: metilino-sensível.

**Tabela 5** – Atividade quelante de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  em %, dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina e das frações (< 3 kDa) de peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise. Concentração de  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Tempo (h)	Quelante de $\text{Cu}^{2+}$	Quelante de $\text{Fe}^{2+}$	Fração	Quelante de $\text{Cu}^{2+}$	Quelante de $\text{Fe}^{2+}$
1	15,84±0,53 <sup>e</sup>	25,92±0,57 <sup>f</sup>	P1	17,51±0,69 <sup>d</sup>	46,17±1,87 <sup>c</sup>
3	17,59±0,27 <sup>e</sup>	37,83±0,49 <sup>e</sup>	P2	30,36±0,40 <sup>b</sup>	47,23±1,54 <sup>c</sup>
5	28,85±0,42 <sup>d</sup>	43,19±1,08 <sup>d</sup>	P3	27,14±0,32 <sup>c</sup>	41,05±1,14 <sup>d</sup>
8	39,64±0,73 <sup>c</sup>	51,67±0,55 <sup>c</sup>	P4	35,65±1,06 <sup>a</sup>	59,75±1,44 <sup>a</sup>
12	52,35±0,12 <sup>b</sup>	67,28±1,19 <sup>b</sup>	P5	30,78±0,58 <sup>b</sup>	52,24±2,74 <sup>b</sup>
24	59,61±0,86 <sup>a</sup>	75,33±1,64 <sup>a</sup>			

**Tabela 6** –  $\text{IC}_{50}$  da atividade anti-hipertensiva das frações (< 3 kDa) de peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise.

Fração	$\text{IC}_{50} (\mu\text{g.mL}^{-1})$
P1	89,12±1,64
P2	55,38±2,35
P3	153,67±1,92
P4	49,28±2,17
P5	35,42±1,03

**Tabela 7** – Atividades biológicas residuais do *pool* de hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina, provenientes do ensaio de 12 horas, após o ensaio de digestão gastrointestinal.

Micro-organismos	Atividade Antimicrobiana (%)					
	Saliva	Digestão Gástrica			Digestão Intestinal	
	10 min.	60 min.	120 min	60 min.	120 min.	
<i>S. aureus</i> MR	65,82±2,11	63,15±1,93	60,57±2,62	67,29±3,05	72,94±2,73	
<i>S. aureus</i> MS	64,53±3,57	62,22±2,14	65,17±1,46	63,38±1,24	67,61±3,27	
<i>B. cereus</i>	32,19±2,80	28,35±1,78	33,81±1,29	38,46±3,57	35,94±2,33	
<i>E. coli</i>	-	-	8,53±1,83	10,34±2,79	12,45±1,64	
<i>P. aeruginosa</i>	35,49±1,28	38,74±2,65	42,37±2,50	39,94±2,08	41,89±1,26	
<i>L. monocytogenes</i>	47,91±0,73	45,11±1,93	48,20±1,34	52,03±1,72	54,61±2,59	

	Atividade Antioxidante					
	Saliva	Digestão Gástrica			Digestão Intestinal	
	10 min.	60 min.	120 min	60 min.	120 min.	
ABTS (%)	95,17±0,03	95,61±0,01	95,45±0,25	97,67±0,78	96,12±0,62	
DPPH (%)	35,68±0,81	42,14±0,27	46,69±1,49	38,79±1,69	33,97±0,76	
ORAC-FL*	2,85±0,05	2,98±0,04	3,59±0,06	3,87±0,10	3,80±0,01	
Cu <sup>2+</sup> (%)	47,95±0,24	45,97±0,31	43,75±1,25	49,55±0,46	49,73±0,74	
Fe <sup>2+</sup> (%)	61,71±1,04	65,25±1,32	63,55±1,31	58,24±1,71	59,98±1,17	

	Atividade Anti-hipertensiva (%)					
	Saliva	Digestão Gástrica			Digestão Intestinal	
	10 min.	60 min.	120 min	60 min.	120 min.	
	91,28±1,36	85,63±1,04	81,71±1,21	77,43±0,43	78,69±1,08	

\*=  $\mu\text{mol de TE.mg de proteína}^{-1}$

**Tabela 8** – Peptídeos identificados por espectrometria de massa (MS/MS) das frações (< 3 kDa) provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise da caseína caprina.

Fração	Sequência	Massa Exp.	Massa Calc.	Fonte de Proteína
		(Da)	(Da)	
P1	RDMPIQAF	976,49	976,48	$\beta$ -caseína (196-203)
	AVPQRDMPIQAF	1371,70	1371,70	$\beta$ -caseína (192-203)
	MGVPKVKETMVPKHKEMPF*	2228,07	2228,15	$\beta$ -caseína (108-126)
	DKIHPPFAQAQSLVYPFTGPI	2228,07	2228,16	$\beta$ -caseína (62-81)
	EQEELNVVGETVESLSSSEES	2279,97	2280,01	$\beta$ -caseína (17-37)
	HKEMPFKYPVEPFOTESQS*	2293,05	2293,07	$\beta$ -caseína (121-139)
	MPFPKYPVEPFOTESQSLTLT	2311,04	2311,14	$\beta$ -caseína (124-143)
	SQPKVLPVPQKAVPQRDMPIQAF	2573,44	2573,42	$\beta$ -caseína (181-203)
MVPKHKEMPFKYPVEPFOTESQ	2645,32	2645,30	$\beta$ -caseína (117-138)	
P2	FPKYPVEPFOTES	1439,67	1439,70	$\beta$ -caseína (126-137)
	DELQDKIHPPFAQ	1439,67	1439,70	$\beta$ -caseína (58-69)
	EMPFKYPVEPF	1479,69	1479,71	$\beta$ -caseína (123-134)
	KVKETMVPKHKEM	1583,81	1583,85	$\beta$ -caseína (112-124)
	LQPEIMGVPKVKET*	1583,81	1583,86	$\beta$ -caseína (103-116)
	VKETMVPKHKEMPF	1699,95	1699,88	$\beta$ -caseína (113-126)
	HKEMPFKYPVEPF	1744,84	1744,86	$\beta$ -caseína (121-134)
	YQEPVLPVVRGPFIL	1780,97	1780,99	$\beta$ -caseína (206-221)
	YQEPVLPVVRGPFILV	1880,04	1880,06	$\beta$ -caseína (206-222)
	LLYQEPVLPVVRGPFILV	2106,22	2106,22	$\beta$ -caseína (204-222)
	PKHKEMPFKYPVEPFOTES	2200,11	2200,10	$\beta$ -caseína (119-136)
	MVPKHKEMPFKYPVEPF	2200,11	2200,12	$\beta$ -caseína (117-134)
	P3	HLPLPLVQ	915,55	915,55
RDMPIQAF		976,49	976,48	$\beta$ -caseína (196-203)
VVPQRDMPIQ*		1197,57	1197,62	$\beta$ -caseína (192-201)
KEMPFKYPV		1250,63	1250,64	$\beta$ -caseína (122-131)
YQEPVLPVVRGP		1310,65	1310,70	$\beta$ -caseína (206-217)
EMPFKYPVEPF		1479,71	1479,71	$\beta$ -caseína (123-134)
ETMVPKHKEMPF**		1504,71	1504,71	$\beta$ -caseína (115-126)
SWMHQPPQPLSPT		1504,71	1504,71	$\beta$ -caseína (157-169)
TVPAKSCQDQPTTLARHPHP		2183,12	2183,09	$\kappa$ -caseína (103-122)
FPKYPVEPFOTESQSLTLTDV		2297,18	2297,15	$\beta$ -caseína (126-145)
P4	IFTCLL	708,38	708,39	$\alpha_{S2}$ -caseína (5-10)
	KFPQYL	794,44	794,43	$\alpha_{S2}$ -caseína (107-112)

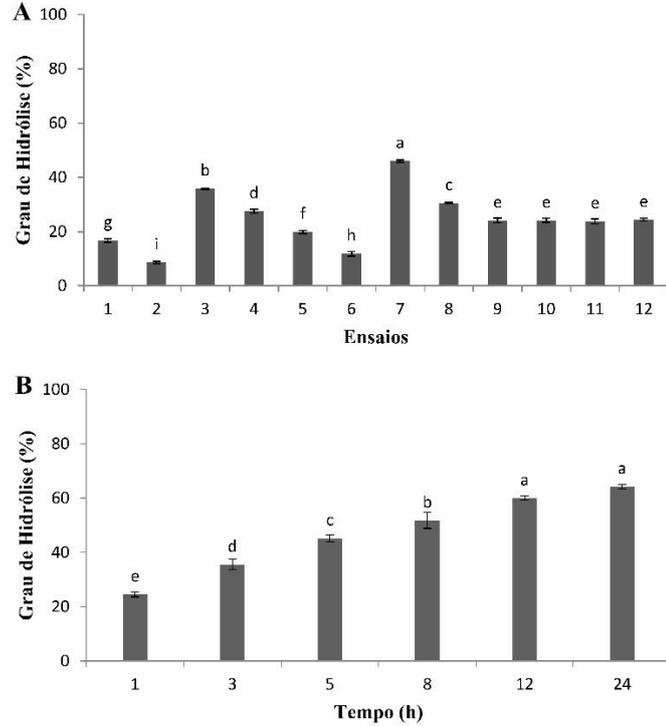
	VLSRYPS	820,43	820,44	κ-caseína (52-58)
	NMAIHPR*	853,46	853,42	α <sub>S2</sub> -caseína (41-47)
	AIPYVRYL	993,57	993,56	α <sub>S2</sub> -caseína (216-223)
	HPHLSFMAI*	1067,53	1067,52	κ-caseína (121-129)
	KFPQYLQY	1085,56	1085,55	α <sub>S2</sub> -caseína (107-114)
	NPWDQVKRN	1155,59	1155,58	α <sub>S2</sub> -caseína (123-131)
	NYYQQRPV	1250,65	1250,64	κ-caseína (62-71)
	SYGLNYYQRPV	1486,72	1486,72	κ-caseína (58-69)
	CQDQPTTLARHPH	1502,71	1502,70	κ-caseína (109-121)
P5	TTMPLW	747,37	747,36	α <sub>S1</sub> -caseína (209-214)
	FYPQLF	813,41	813,41	α <sub>S1</sub> -caseína (160-165)
	PSGAWYY	842,38	842,36	α <sub>S1</sub> -caseína (175-181)
	SGAWYYL	858,40	858,39	α <sub>S1</sub> -caseína (176-182)
	NENLLRF	904,48	904,48	α <sub>S1</sub> -caseína (32-38)
	ELSKDIGSE	976,49	976,47	α <sub>S1</sub> -caseína (54-62)
	MKEGNPAHQ	1010,47	1010,46	α <sub>S1</sub> -caseína (138-146)
	DAYPSGAWY	1028,43	1028,42	α <sub>S1</sub> -caseína (172-180)
	DQAMEDAKQ*	1050,41	1050,43	α <sub>S1</sub> -caseína (66-74)
	FSDIPNPIGSENSG	1432,64	1432,65	α <sub>S1</sub> -caseína (194-207)
	YQLDAYPSGAWY	1432,64	1432,63	α <sub>S1</sub> -caseína (169-180)

---

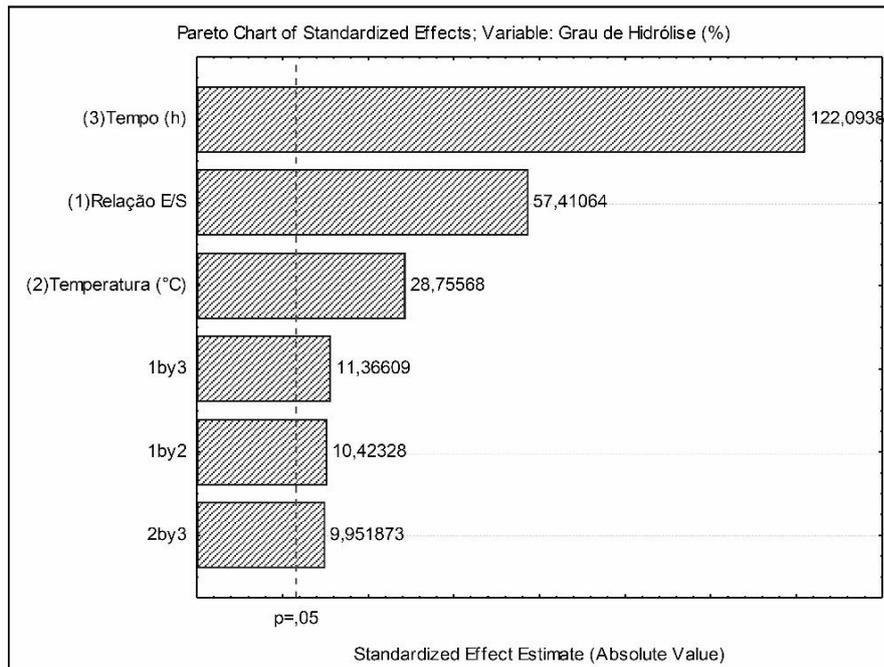
\* + Oxidação (M). \*\* 2+ Oxidação (M)

**FIGURAS**

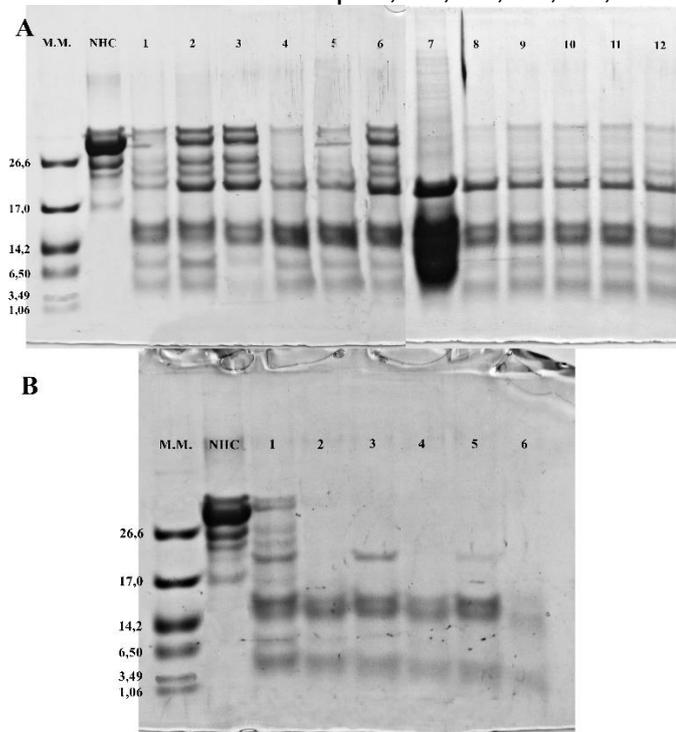
**Figura 1** – (A). Grau de hidrólise da caseína caprina no planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. (B). Grau de hidrólise da caseína caprina a partir do ensaio 7 em função do tempo. As barras de erro representam o desvio padrão.



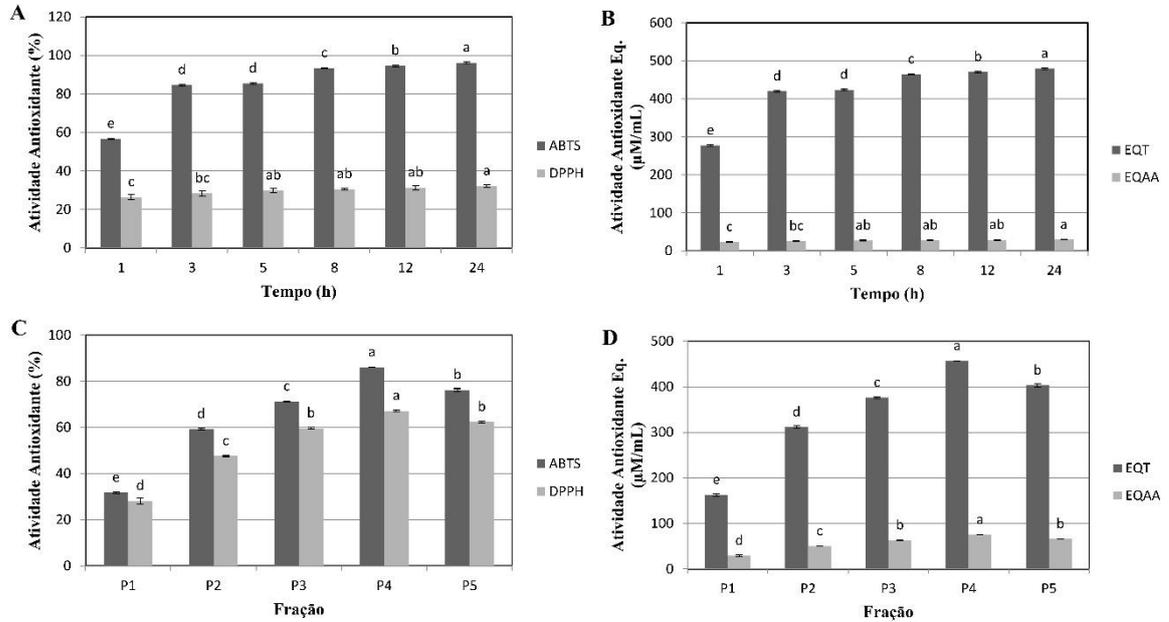
**Figura 2** – Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis no GH da caseína caprina hidrolisada pela protease purificada do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133 de acordo com o planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.



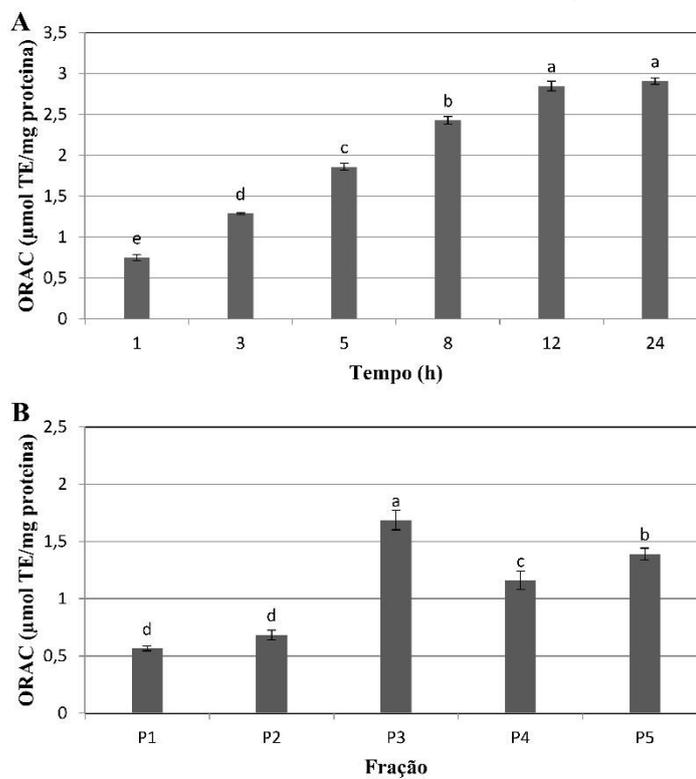
**Figura 3** – (A). Gel de Tricina-SDS-PAGE do planejamento fatorial  $2^3$  da caseína caprina hidrolisada, sendo os números 1-12 correspondentes aos seus respectivos ensaios, M.M.: Marcador Molecular e NHC: Caseína não hidrolisada. (B). Gel de Tricina-SDS-PAGE do ensaio 7 da hidrólise da caseína caprina em função do tempo, sendo os números 1-6 referentes aos tempos, 1h, 3h, 5h, 8h, 12h e 24h.



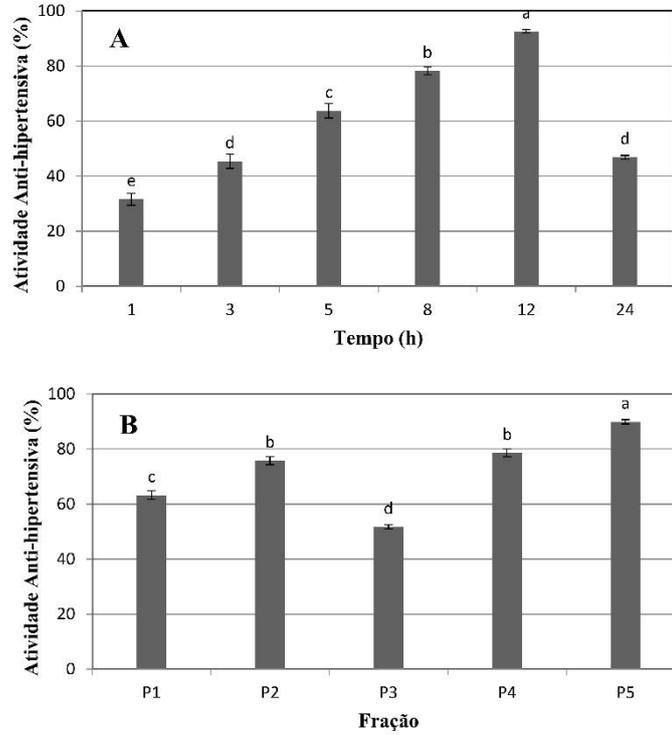
**Figura 4** – (A). Atividade antioxidante (%) do ABTS e DPPH dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (B). Atividade antioxidante Equivalente ( $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do ABTS e DPPH dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (C). Atividade antioxidante (%) do ABTS e DPPH das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas. (D) Atividade antioxidante Equivalente ( $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do ABTS e DPPH das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas.



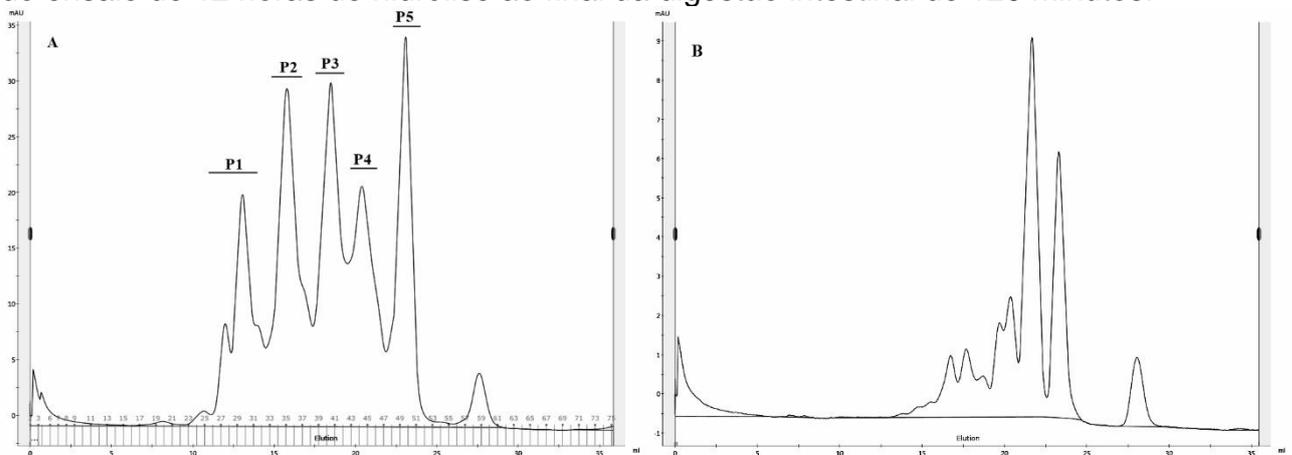
**Figura 5** – (A). Atividade de ORAC-FL dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (B). Atividade de ORAC-FL das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas. As barras de erro representam o desvio padrão.



**Figura 6 – (A).** Atividade anti-hipertensiva (%) dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. **(B).** Atividade anti-hipertensiva das frações (< 3 kDa) de peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas. As barras de erro representam o desvio padrão.



**Figura 7 – (A).** Cromatograma de exclusão molecular das frações (< 3 kDa) dos peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise da caseína caprina. **(B).** Cromatografia de exclusão molecular da frações (< 3 kDa) dos peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise ao final da digestão intestinal de 120 minutos.



## **CAPÍTULO VI:**

**Propriedades bioativas de peptídeos obtidos a partir da hidrólise da caseína caprina por uma serina protease produzida pelo fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848**

## **Propriedades bioativas de peptídeos obtidos a partir da hidrólise da caseína caprina por uma serina protease produzida pelo fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848**

José Erick Galindo Gomes<sup>a</sup>, Maria Manuela Estevez Pintato<sup>b</sup>, Eleni Gomes<sup>a</sup>, Keila Aparecida Moreira<sup>c</sup>, Roberto da Silva<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE – UNESP – Rua Cristóvão Colombo 2265, São José do Rio Preto, São Paulo, CEP 15054-000, Brasil.

<sup>b</sup>Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa/Porto, Rua Arquiteto Lobão Vital, Apartado 2511, 4200 Porto, Portugal.

<sup>c</sup>Laboratório de Microbiologia, Tecnologia Enzimática e Bioprodutos – Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE - Avenida Bom Pastor, s/n.º, Garanhuns, Pernambuco, CEP 55292-278, Brasil

\*Autor de correspondência: [dasilva@ibilce.unesp.br](mailto:dasilva@ibilce.unesp.br)

**Resumo:** A hidrólise enzimática da caseína caprina com a protease purificada do fungo filamentosso *Mucor guilliermondii* URM 5848 foi realizada para obtenção de hidrolisados com massa molecular < 3 kDa e avaliação do potencial destes peptídeos nas atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-hipertensivas. O maior grau de hidrólise (GH) obtido a partir do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> foi de 22,81% no ensaio 7 (Enzima/substrato = 1:5; 40 °C; 5 h). A avaliação do grau de hidrólise deste ensaio em função do tempo revelou máximo de 41,45% após as 24 horas, entretanto, a avaliação das atividades biológicas apresentou melhores resultados para os hidrolisados no tempo de 12 horas (Enzima/substrato = 1:5; 40 °C; GH – 36,72%), principalmente para a atividade anti-hipertensiva, com resultado de 83,42% de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA). Cinco frações (P1, P2, P3, P4 e P5) deste mesmo ensaio foram separadas por cromatografia de exclusão molecular em sistema FPLC e apresentaram diferentes níveis de atividades biológicas. Foram identificados por MALDI-TOF/TOF, em média, 10 peptídeos para cada uma das frações (47 sequências), com algumas, inéditas.

**Palavras-chave:** leite de cabra, enzimas proteolíticas, atividades biológicas

## 1. INTRODUÇÃO

As caseínas, partículas de dimensões coloidais, representam as proteínas predominantes no leite, aproximadamente 80% do conteúdo proteico. São constituídas por um grupo heterogêneo de fosfoproteínas que estabilizam o fosfato de cálcio em estruturas micelares. E compostas por quatro frações principais ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseína). Estas micelas apresentam nano partículas de fosfato de cálcio, ligadas aos grupos fosfoserina das frações  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - e  $\beta$ -caseína e estão em equilíbrio com as concentrações de cálcio e fosfato presentes na fase solúvel. Além disso, a  $\kappa$ -caseína é responsável por formar uma camada na superfície das micelas para auxiliar no processo de estabilização (NAIR et al., 2014).

A hidrólise da caseína por ação enzimática é capaz de liberar moléculas com atividades biológicas variadas. Os peptídeos bioativos derivados da caseína apresentam diversas atividades biológicas e podem auxiliar várias funções fisiológicas dos organismos. Atividades antimicrobianas e antioxidantes, funções antitrombóticas, anti-hipertensivas e imunomoduladoras são descritas para estas moléculas. Estas substâncias são obtidas principalmente por hidrólise enzimática e são adicionadas com frequência nos alimentos, para a melhoria funcional das suas propriedades nutricionais. Muitas enzimas comerciais como a tripsina, quimotripsina e pepsina, são utilizadas para hidrolisar caseínas e obter peptídeos bioativos essenciais (SU et al., 2012).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) apresentam diferentes comprimentos, sequência de aminoácidos, cargas aniônicas ou catiônicas e diferenças estruturais. Apesar dessas diversidades, essas moléculas possuem algumas características em comum, como por exemplo, a natureza anfipática dos seus sítios ativos. Devido as suas propriedades antimicrobianas de largo espectro, estes peptídeos foram rapidamente propostos como substâncias com ação antimicrobiana para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos (BROGDEN; BROGDEN, 2011).

A caseicidina é um dos primeiros peptídeos antimicrobianos descritos e purificados que apresentou efeito de inibição contra estirpes de *Staphylococcus* spp., *Sarcina* spp., *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* (SILVA; MALCATA, 2005). A israicidina, derivada da fração  $\alpha_{s1}$ -da caseína (F1-23: Arg-Pro-Lis-His-Pro-Ile-Lis-His-Gln-Gli-Leu-Pro-Gln-Glu-Val-Leu-Asn-Glu-Asn-Leu-

Arg-Phe) apresenta além de sua atividade antimicrobiana, funções imunomoduladoras e podem atuar também como peptídeo opióide no sistema nervoso (PHELAN et al., 2009).

Além dos peptídeos antimicrobianos, o interesse em encontrar compostos antioxidantes, encontra-se em constante crescimento ao longo dos anos, principalmente aqueles presentes em alimentos, pois estas substâncias podem proteger o corpo humano contra o ataque dos radicais livres e retardar o progresso de muitas doenças crônicas, bem como impedir a oxidação lipídica em alimentos (KADRI et al., 2011).

Das proteínas de origem animal, a caseína, bem como seus hidrolisados e peptídeos, é muito estudada quanto à atividade antioxidante. Alguns autores sugerem a importância de resíduos de leucina, que pode estar relacionada à eliminação de radicais (KIM et al., 2007; XIE et al., 2013), à atividade quelante de íons e à inibição da oxidação em lipídios (PHELAN et al., 2009).

Outro benefício importante dos peptídeos derivados da caseína ocorre na sua capacidade de auxiliar no controle da pressão arterial, já que, os distúrbios da pressão arterial corpórea representam um dos principais problemas de saúde na atualidade. Neste caso, a hipertensão arterial possui proporções epidêmicas e afeta aproximadamente cerca de 30% da população adulta mundial. Esta enfermidade é considerada uma alteração fisiológica crônica que carrega um fator de risco para outros distúrbios, como por exemplo, a arteriosclerose, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e insuficiência renal (BALTI et al., 2015).

Os peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), responsável pelo aumento da pressão arterial, desempenham um importante papel fisiológico na regulação da hipertensão. Pois, uma vez que a concentração de angiotensina diminui no sistema circulatório, tem-se uma diminuição da pressão arterial. Algumas evidências sugerem que, o aumento na ingestão de proteínas, reduz a pressão sanguínea, o que fundamenta as alternativas não-farmacológicas tanto para a prevenção, quanto para o controle da pressão arterial sistêmica (COSTA; GONTIJO; NETTO, 2007; WU et al., 2013). Os principais peptídeos descritos que apresentam elevada atividade de inibição da ECA são o IPP e o VPP, derivados da fração  $\beta$ -caseína a partir da fermentação de *Lactobacillus helveticus* (NAKAMURA et al., 1995; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2014).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as atividades biológicas de hidrolisados e peptídeos multifuncionais provenientes da caseína caprina a partir da hidrólise realizada por uma protease purificada sintetizada pelo fungo filamentosso *Mucor guilliermondii* URM 5848.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Obtenção do caseínato de sódio caprino**

O leite cru foi coletado de um rebanho leiteiro de cabras da raça Saanen e imediatamente armazenado a 4 °C. O processo de obtenção da caseína caprina, na forma de caseínato de sódio, ocorreu através da metodologia proposta por Egito et al. (2006), com modificações. Inicialmente, o leite foi desnatado por centrifugação (2100 x g por 30 min a 32 °C) e a caseína total obtida mediante precipitação isoelétrica em pH 4,2 com HCl 1 M. O precipitado foi separado por centrifugação a 2200 x g por 20 min, a 10 °C, lavado três vezes com água destilada e solubilizado em pH 7,0 através da adição de NaOH 1 M. Esse ciclo de precipitação-lavagem-dissolução se repetiu por mais duas vezes. O precipitado de caseína, denominado de caseínato de sódio, foi dialisado contra água ultrapura a 4 °C, por 72h, posteriormente liofilizado e estocado a -20 °C.

### **2.2. Determinação da atividade proteolítica**

A atividade proteolítica da protease purificada produzida pelo fungo filamentosso *Mucor guilliermondii* URM 5848, foi monitorada de acordo com o método descrito por Leighton et al. (1973), utilizando a azocaseína 1% (m/v), diluída em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0, como substrato. Para a reação, 60 µL da protease purificada foram adicionados a 100 µL do substrato e incubados na ausência de luz durante 1 hora. Posteriormente, 480 µL de ácido tricloroacético 10% (m/v) foram adicionados a mistura reacional e os ensaios centrifugados durante 5 minutos (3000 x g - 4 °C). Logo após, 320 µL do sobrenadante foram misturados a 560 µL de NaOH 1 M. A atividade enzimática foi definida como a variação de 0,01 na absorvância a 440 nm durante uma hora. As dosagens enzimáticas foram expressas em U.mL<sup>-1</sup>, e todos os ensaios realizados em triplicata.

### **2.3. Hidrólise da caseína caprina**

A caseína caprina foi dissolvida para uma concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup> em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5, seguindo a metodologia proposta por Egito et al. (2007). Para a hidrólise da caseína foi utilizada uma protease purificada produzida pelo fungo filamentoso *Mucor guilliermondii* URM 5848. Inicialmente, foi realizado planejamento fatorial 2<sup>3</sup> (Tabela 1), com o intuito de verificar as melhores condições de atuação da enzima para a degradação da caseína. Posteriormente, o ensaio que apresentou maior grau de hidrólise foi avaliado de forma a monitorar a hidrólise da caseína ao longo do tempo (1, 3, 5, 8, 12 e 24 horas) e só assim, verificar qual o tempo de hidrólise proporcionou a liberação de peptídeos com as melhores atividades biológicas. Após a realização de cada hidrólise, a reação enzimática foi interrompida por choque térmico e as amostras submetidas a banho fervente durante 10 minutos para a desnaturação das proteases.

#### 2.4. Determinação do grau de hidrólise (GH)

O grau de hidrólise, definido como a quantidade de ligações peptídicas clivadas, ou o número de grupos amino formados durante o processo de hidrólise, foi determinado de acordo com a metodologia proposta por Adler-Nissen (1979), que utiliza o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Para a reação, 250 µL das amostras do hidrolisado de caseína, foram incubados com 2 mL de tampão fosfato de sódio, 0,2125 M, pH 8,2 e 2 mL do TNBS 0,1% (v/v) diluído em água ultra pura. A reação ocorreu a 50 °C durante 60 minutos. Transcorrido este período, foram adicionados 4 mL de HCl 0,1 N para interromper a reação. A mistura reacional foi mantida em temperatura ambiente durante 30 minutos e posteriormente analisada em espectrofotômetro a 340 nm. Para a curva de calibração, a L-leucina foi utilizada como aminoácido padrão, com variação nas concentrações entre 0,25 – 10 mM. O GH (%) foi calculado de acordo com a equação 1:

$$GH(\%) = \left( \frac{AN_2 - AN_1}{N_{pb}} \right) * 100 \quad (1)$$

AN<sub>1</sub> corresponde ao conteúdo de nitrogênio amino antes da hidrólise em mg.g<sup>-1</sup> de proteína, AN<sub>2</sub> corresponde ao conteúdo de nitrogênio amino depois da hidrólise em mg.g<sup>-1</sup> de proteína. E N<sub>pb</sub>, corresponde ao conteúdo total de nitrogênio amino

presente contido nas ligações peptídicas do substrato proteico. Vale salientar que, os valores de AN<sub>1</sub> e AN<sub>2</sub> foram obtidos com base na curva padrão gerada com L-leucina, e N<sub>pb</sub>, de acordo com a metodologia de Micro-Kjeldahl (AOAC, 1990).

## **2.5. Eletroforese Tricina-SDS-PAGE dos hidrolisados**

As amostras para a eletroforese foram preparadas com uma quantidade de 20 µL de cada solução dos hidrolisados e 480 µL de tampão de amostra (2x Sample Buffer – Sigma S3047), composto por tampão Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, 24% (v/v) de glicerol, 1% de dodecil sulfato de sódio, 4% (v/v) de β-mercaptoetanol e 0,02% de Coomassie Brilliant Blue G. Foi utilizado o marcador molecular (Ultra Low Range Molecular Weight Marker – Sigma M3546) composto por triosefosfato isomerase (26,600 Da); mioglobina (17,000 Da); α-lactalbumina (14,200 Da); aprotinina (6,500 Da); insulina B (3,496 Da) e bradicinina (1,060 Da). A eletroforese Tricina-SDS-PAGE dos hidrolisados e da caseína não hidrolisada transcorreu segundo Schägger e Jagow (1987), com algumas modificações. O gel de concentração foi composto por 4,9% de poliacrilamida (29:1) e o gel de corrida 15,4%. A corrida das amostras no gel foi realizada a 150 V durante 60 minutos.

Após a migração eletroforética o gel foi submetido ao processo de coloração. Inicialmente foi utilizada uma solução fixadora com 40% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético, durante 30 minutos. Posteriormente, o gel foi corado com uma solução que continha 10% (v/v) de ácido acético e 0,25 g (m/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250 durante 1 hora e descorado em uma solução de 10% (v/v) de ácido acético.

## **2.6. Determinação de proteína total**

O Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) foi usado para a determinação da concentração de proteínas nos experimentos das atividades biológicas. Foi utilizado soroalbumina bovina como proteína padrão em concentrações que variam entre 0 – 2000 µg.mL<sup>-1</sup>.

## **2.7. Avaliação das atividades biológicas dos hidrolisados**

A avaliação das atividades biológicas dos hidrolisados ocorreu de duas formas distintas. Primeiro, os ensaios que hidrolisaram a caseína caprina em diferentes tempos (1, 3, 5, 8, 12 e 24 horas) foram centrifugados a 5000 x g a 4 °C e o

sobrenadante utilizado para obtenção de um *pool* de peptídeos com massas moleculares menores que 3 kDa, utilizando Amicon Ultra-15 (Merck Millipore). Posteriormente, o ensaio que apresentou melhores resultados de atividade foi utilizado para o processo de purificação por exclusão molecular, em sistema FPLC e posteriormente, realizada uma nova avaliação do potencial de atividade das frações coletadas neste processo.

## **2.8. Atividade antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana das frações de peptídeos (< 3 kDa) foi realizada pelo método de turbidez descrito por Mine, Ma e Lauriau (2004) com modificações. Foram utilizadas as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (MRSA) (CCUG 60578), *Staphylococcus aureus* meticilino-sensível (MSSA) (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (NCTC 2599) e *Listeria monocytogenes* (ESB 3572).

Para a determinação da atividade antimicrobiana, as colônias de bactérias foram ativadas em 10 mL de caldo triptona de soja (TSB) e incubadas a 37 °C durante 15 horas. A suspensão de cada bactéria foi inoculada em caldo TSB até atingir escala logarítmica de crescimento determinada por absorvância a 620 nm e padronizada uma quantidade de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Microplacas de 96 poços de fundo plano, de poliestireno e estéreis (Corning®), foram utilizadas para o ensaio. A mistura de 50 µL (500 µg.mL<sup>-1</sup>) de cada fração de peptídeos foi realizada com 45 µL de caldo Mueller Hinton (CMH) e 5 µL da suspensão bacteriana. O controle positivo apresentou apenas CMH e suspensão bacteriana. Já no controle negativo foi utilizado o cloranfenicol na concentração de 300 µg.mL<sup>-1</sup>. Após a incubação das placas a 37 °C durante 24 horas procedeu-se a leitura em leitora de microplaca Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) a 620 nm.

## **2.9. Avaliação da atividade antioxidante total**

### **2.9.1. Atividade sequestradora de radicais ABTS<sup>•+</sup> e DPPH**

A atividade sequestradora de radicais livres das frações de peptídeos foi determinada com o radical cátion ABTS<sup>•+</sup>, gerado a partir do 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) de acordo com Re et al. (1999) modificada. Para formação do radical ABTS<sup>•+</sup>, persulfato de potássio e ABTS foram preparados a uma concentração final de 2,45 e 7 mM, respectivamente, e incubado

ao abrigo da luz por 16 h a temperatura ambiente. A absorvância da solução do radical foi ajustada para  $0,70 \pm 0,02$  a 734 nm, com espectrofotômetro, por diluição em tampão fosfato-salino 100 mM (PBS), pH 7,4. Para a reação, 50  $\mu\text{L}$  ( $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) das amostras foram misturados com 950  $\mu\text{L}$  da solução do radical ABTS<sup>•+</sup>. Os ensaios foram incubados a 30 °C durante seis minutos e lidos a 734 nm, em triplicata. A curva padrão foi obtida com Trolox (1-500  $\mu\text{M}$ ) como substância antioxidante padrão. A atividade antioxidante (%) foi calculada em relação à atividade de eliminação do radical, de acordo com a seguinte equação 2:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \left( \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde,  $A_{\text{controle}}$  representa à absorvância inicial do ABTS e  $A_{\text{amostra}}$  a absorvância após a adição da respectiva amostra que continha os peptídeos.

Outro radical livre utilizado para avaliar o potencial de atividade antioxidante foi o 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). A avaliação da atividade sequestradora do DPPH foi realizada segundo a metodologia descrita por Li et al. (2013), com algumas modificações. O radical DPPH (0,2 mM) foi preparado através de uma solução composta por 30% água e 70% etanol. Neste caso, 750  $\mu\text{L}$  de amostra ( $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foram misturados a 750  $\mu\text{L}$  da solução com o radical DPPH. A reação ocorreu durante 30 minutos ao abrigo de luz e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 517 nm. A curva padrão foi preparada com ácido ascórbico (1-100  $\mu\text{M}$ ) como antioxidante padrão. A atividade antioxidante (%) foi calculada seguindo a mesma formula da metodologia de ABTS.

### 2.9.2. Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC)

O teste de capacidade de absorção radical de oxigênio (ORAC) foi baseado pelo método proposto por Contreras et al. (2011). Resumidamente, a reação foi realizada a 40 °C em tampão fosfato-salino (PBS) 75 mM (pH 7,4) e a mistura de ensaio final (200  $\mu\text{L}$ ) continha fluoresceína (70 nM), 2,2-Azobis(2-metilpropianomidina) dihidroclorido – AAPH (14 mM) e o antioxidante padrão Trolox (0,2–1,6  $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ou amostra (em diferentes concentrações). A fluorescência foi registrada durante 137 minutos (104 ciclos) em leitor de placas FLUOstar OPTIMA

(BMG Labtech, Offenburg, Alemanha) com filtros de excitação de 485 nm e de emissão de 520 nm. O equipamento foi controlado pela versão do software FLUOstar Control (1.32 R2) para medição de fluorescência. Foram utilizadas microplacas de 96 poços de poliestireno preto (Nunc, Dinamarca). As soluções de AAPH e Trolox foram preparadas diariamente e a fluoresceína foi diluída a partir de uma solução de reserva (1,17 mM) em tampão fosfato-salino 75 mM (pH 7,4). Todas as misturas reacionais foram preparadas em duplicata e pelo menos três corridas independentes realizadas para cada amostra. Os valores finais de ORAC-FL foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox equivalente (TE). $\text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>.

### 2.9.3. Atividade quelante de íons metálicos

A atividade quelante de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) foi determinada de acordo com Saiga et al. (2003) com modificações propostas por Sánchez-Vioque et al. (2013). Para a reação, 0,5 mL ( $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) de amostra foi misturado com 2 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0 e 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuSO}_4$  5 mM. Após 30 min. de incubação em temperatura ambiente foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de pirocatecol violeta (PV) 4 mM. A mistura reacional foi homogeneizada e a reação continuada por mais 30 min., posteriormente, mensurada a 620 nm. Água deionizada foi utilizada como controle negativo, em substituição à amostra e uma solução de EDTA 0,045% utilizada como substância quelante padrão. A porcentagem de inibição de formação do complexo PV- $\text{Cu}^{2+}$  foi calculada da seguinte forma:  $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$ . Onde,  $A_0$  corresponde à absorvância do controle negativo, e  $A_1$  a absorvância das amostras.

A atividade quelante de ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Sánchez-Vioque et al. (2013). Para a reação, 0,5 mL ( $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) de amostra foi misturado com 2 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,9 e 50  $\mu\text{L}$  de cloreto de ferro (II) 2 mM. Após 30 min. de incubação em temperatura ambiente foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de ferrozina 5 mM. A mistura reacional foi homogeneizada, a reação continuada por mais 30 min. E posteriormente, mensurada a 562 nm. Água deionizada foi utilizada como controle negativo, em substituição à amostra e uma solução de EDTA 0,045% utilizada como substância quelante padrão. A porcentagem de inibição de formação do complexo ferrozina- $\text{Fe}^{2+}$  foi calculada da seguinte forma:  $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$ . Onde,  $A_0$  corresponde à absorvância do controle negativo, e  $A_1$  a absorvância das amostras.

### 2.10. Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA)

A atividade anti-hipertensiva foi realizada segundo a metodologia descrita por Holmquist et al. (1979) com modificações (ASOODEH; YAZDI; CHAMANI, 2012), que utiliza o N-[3-(2-Furil)acrilóil]-Phe-Gly-Gly (FAPGG) como substrato. Em cada teste das amostras o ensaio foi realizado com 22 µL da ECA (50 mU.mL<sup>-1</sup>), 50 µL da amostra (250 µg.mL<sup>-1</sup>), 100 µL de FAPGG (0,5 mM) e 150 µL de tampão ECA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 0,3 M de NaCl e 1 mM de ZnCl<sub>2</sub>). A mistura reacional foi incubada durante 60 min. e a reação monitorada a cada 10 min. em leitora de microplaca Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) a 340 nm. A amostra controle foi feita substituindo a amostra por tampão ECA. Para o cálculo da atividade anti-hipertensiva (%), foi utilizada a equação 3:

$$Inibição da ECA (\%) = \left[ 1 - \left( \frac{\Delta A_{inibidor}}{\Delta A_{controle}} \right) \right] * 100 \quad (3)$$

O valor de IC<sub>50</sub> da amostra que apresentou melhores resultados prévios foi definido como a concentração necessária para inibir 50% da atividade da ECA. Para isto, um total de cinco concentrações diferentes de amostra que continha os peptídeos inibidores foram utilizadas para avaliar a % de inibição da ECA. O IC<sub>50</sub> foi obtido por regressão linear plotando a % de inibição contra as diferentes concentrações da amostra. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### 2.11. Avaliação do processo de digestão *in vitro* sob as atividades biológicas

O ensaio de hidrólise em função do tempo (< 3 kDa) que apresentou melhores resultados para as atividades biológicas no geral, foi submetido ao processo de digestão *in vitro* com a finalidade de avaliar as atividades biológicas residuais e verificar dessa forma, o comportamento e a resistência dos peptídeos frente as enzimas digestivas. Para isso, o ensaio de digestão *in vitro* foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Wang, Wang e Li (2016) com algumas modificações. Inicialmente, 10 mL da amostra (1 mg.mL<sup>-1</sup> de proteína) foram misturados com 12 mL da fase oral que continha 100 U.mL<sup>-1</sup> de α-amilase porcina (Sigma- Aldrich) e CaCl<sub>2</sub> 1 mM com pH entre 5,6 – 6,9, durante 10 minutos a 37 °C, após este período uma

alíquota foi coletada. Em seguida, o pH foi ajustado para 2,0 com HCl 100 mM e adicionada pepsina porcina (Sigma- Aldrich) em uma proporção de enzima/substrato de 1:50 e a mistura reacional incubada em banho-maria durante duas horas a 37 °C com agitação de 200 rpm. Neste período, duas alíquotas foram retiradas nos tempos de 60 e 120 minutos. Posteriormente, o pH foi ajustado para 5,3 com NaHCO<sub>3</sub> 0,9 M e, subsequentemente, ajustado para pH 7,5 com NaOH 2 M. A pancreatina foi adicionada ao ensaio na proporção enzima/substrato de 1:25 e a reação continuou por mais 2 horas a 37 °C em banho-maria com agitação constante de 200 rpm. Mais duas alíquotas foram retiradas nos tempos de 60 e 120 minutos. Todas as alíquotas foram submersas em banho fervente durante 10 minutos para a inativação das enzimas e passadas pelo processo de ultrafiltração com Amicon Ultra-15 (Merck Millipore) com membrana de corte < 3 kDa. Posteriormente, foram liofilizadas, ressuspendidas nas mesmas concentrações utilizadas para as atividades biológicas e armazenadas em -80 °C para análises posteriores.

### **2.12. Cromatografia de exclusão molecular**

A purificação parcial da amostra do ensaio com melhores resultados para as atividades biológicas foi realizada por meio da distribuição da massa molecular dos peptídeos presentes no *pool* de hidrolisados, por cromatografia de exclusão molecular em sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography – ÄktaPurifier GE Healthcare) com coluna Superdex Peptide 10/300 GL acoplada. O sistema foi operado com uma taxa de fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> e teve como eluente tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5. Foi injetado um volume de 0,5 mL por corrida e os picos coletados para a realização das atividades biológicas. As corridas foram monitoradas com uma absorvância de 280 nm e duração de 75 minutos.

### **2.13. Análise por espectrometria de massa**

A identificação dos peptídeos foi realizada por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF (4800 Plus, SCIEX). Os picos coletados no FPLC foram enriquecidos e purificados por cromatografia em C18 de fase reversa (ZipTips, Millipore) seguindo as instruções do fabricante e eluídos na placa de amostra de MALDI com a solução de eluição do ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico da matriz MALDI a 8 mg.mL<sup>-1</sup> em 50% de acetonitrila, 0,1% de ácido trifluoroacético e fosfato de amônio 6 mM. Os espectros de massa de péptidos foram adquiridos em modo reflector

positivo na faixa de massa de  $m/z$  700-5000. Os picos com maior intensidade foram selecionados para o sequenciamento peptídico por MS/MS. As proteínas foram identificadas pela abordagem Peptide Mass Fingerprint + MS/MS com o software Mascot (v2.5.1, Matrix Science) a partir do banco de dados da sequência de proteína UniProt para a seleção taxonômica Mucorales e Caprinae (versão 2017\_08). As configurações de pesquisa de proteínas foram a oxidação da metionina (modificação variável), zero clivagens perdidas e tolerância máxima de erro de 50 ppm (MS) e 0,5 Da (MS/MS). As pontuações de proteínas superiores a 67 foram consideradas significativas ( $p < 0,05$ ).

#### **2.14. Análise estatística**

A análise estatística teve como variável resposta o grau de hidrólise dos ensaios e foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA), com a utilização do software Statistica 8.0, para verificar as variáveis com efeitos estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) e o ajuste do modelo aos dados experimentais. Nas demais análises utilizou-se como teste de comparação de médias o Teste de Tukey com nível de 5% de probabilidade, através do programa SPSS Statistics. Todos os ensaios foram realizados em ordem aleatória.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Grau de hidrólise (GH)**

O maior GH da caseína caprina hidrolisada pela protease do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848 para o planejamento fatorial completo  $2^3$ , ocorreu no ensaio 7 ( $22,81\% \pm 0,42$ ), que apresentou diferença estatística entre os demais (Figura 1A). Este ensaio teve como variáveis uma relação E/S de 1:5, temperatura de 40 °C e tempo de 5 horas para a hidrólise. A ANOVA (Tabela 2) demonstrou que, todas as variáveis e suas interações foram estatisticamente significativas. O ajuste do modelo foi medido pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) = 0,991 e  $R^2_{ajuste}$  = 0,981, indica que 99,1% da variação total do grau de hidrólise foi explicado pelo modelo estatístico. A variável tempo, apresentou a maior influência de efeito positivo no processo de hidrólise (Figura 2), dessa forma, quanto maior o tempo maior o GH. As interações entre as variáveis independentes exerceram pouca influência no processo, mesmo as positivas.

O monitoramento do grau de hidrólise do ensaio 7 (Figura 1B) em função do tempo, demonstrou que o maior GH da caseína caprina, ocorreu no ensaio de 24 horas ( $41,45\% \pm 1,10$ ) e foi estatisticamente diferente dos demais. Já os ensaios de 8 horas e 12 horas não apresentaram diferenças estatísticas entre si, com GH de  $34,59\% \pm 1,45$  e  $36,72\% \pm 0,78$ , respectivamente.

As variações que ocorrem no grau de hidrólise da caseína caprina estão relacionadas diretamente com vários fatores e apresenta influências de variáveis como o tempo, tipo de protease utilizada no processo e temperatura. Lira et al. (2010), avaliaram os fatores que influenciam o grau de hidrólise da caseína caprina com a utilização das proteases comerciais pepsina, papaína e tripsina e concluíram que as melhores condições para a hidrólise da caseína caprina foram observadas com temperaturas entre 40 e 50 °C. Além disso, a relação E/S influenciou negativamente a variável resposta tanto para a papaína quanto para a tripsina, o que demonstra que quanto menor for a concentração do substrato, maior será seu GH. Já Bezerra et al. (2013) trabalharam com a hidrólise da caseína caprina com papaína comercial e observaram um grau de hidrólise máximo após as 5 horas de hidrólise (28,5%), entretanto, com uma relação E/S de 1:150.

### **3.2. Eletroforese Tricina-SDS-PAGE**

Além da determinação do GH do caseínato caprino, o perfil de degradação protéica foi acompanhado pelo processo de eletroforese Tricina-SDS-PAGE. As diferentes condições de hidrólise em que a caseína foi submetida com relação à proporção de E/S, tempo e temperatura de hidrólise influenciou diretamente na atuação da protease frente ao substrato. A maior hidrólise e concentração de peptídeos com massas moleculares menores que 10 kDa ocorreu principalmente nos ensaios 5 e 7 (Figura 3A), os mesmos que apresentaram maiores valores de GH. A Figura 3B mostra a degradação da caseína em função do tempo, que é mais acentuada a partir das 8 horas de hidrólise. Segundo Elzoghby, El-Fotoh e Elgindy (2011), a facilidade de clivagem da caseína ocorre pelo fato desta proteína apresentar uma estrutura aberta devido à alta concentração dos resíduos de prolina, as quais dificultam a formação de uma grande quantidade de estruturas secundárias e terciárias, uma vez que os resíduos de prolina interrompem a formação de  $\alpha$ -hélice e folhas  $\beta$ , além de não haver pontes de dissulfeto na estrutura na caseína, o que as torna mais frágeis e mais susceptíveis ao ataque das proteases.

### 3.3. Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana frente a bactérias patogênicas mostrou que, o maior potencial de liberação de peptídeos com capacidade de inibir o crescimento de todos os micro-organismos avaliados, com ação bacteriostática, ocorreu nos tempos 12 horas e 24 horas de hidrólise (Tabela 3). Os melhores resultados foram obtidos para as bactérias *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (CCUG 60578), *Staphylococcus aureus* meticilino-sensível (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) e *Listeria monocytogenes* (ESB 3572). Pode-se observar claramente o aumento da atividade antimicrobiana em função do tempo de hidrólise, entretanto, o ensaio de 12 horas apresentou diferença estatística para quatro bactérias com relação ao ensaio de 24 horas, este fato pode estar relacionado com a degradação de alguns peptídeos potencialmente inibidores ao longo do tempo de hidrólise, havendo a perda de sua funcionalidade.

As frações menores que 3 kDa, separadas por cromatografia de exclusão molecular em FPLC, foram provenientes do ensaio de 12 horas. Um total de cinco frações foi avaliado para a atividade antibacteriana. A fração P4 apresentou melhor desempenho geral (Tabela 4) e foi a única capaz de inibir o crescimento de todas as bactérias. Entretanto, a fração P2 apresentou os maiores resultados de inibição para o *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (CCUG 60578) e o *Staphylococcus aureus* meticilino-sensível (ATCC 25923). Assim como a fração P3, que apresentou o melhor resultado contra a *Listeria monocytogenes* (ESB 3572) e inibiu seu crescimento em  $60,04\% \pm 1,01$ , após 24 horas de análise.

Bougherra et al. (2017) avaliaram o potencial de atividade antimicrobiana de peptídeos obtidos a partir da hidrólise da caseína bovina por uma serina protease purificada do *Lactococcus lactis* subsp *lactis* BR16 e obtiveram potencial de inibição do crescimento de várias bactérias, entre elas a *Escherichia coli* (ATCC 25922), o que comprova a eficiência de proteases produzidas por micro-organismos em liberar peptídeos bioativos. Esmailpour et al. (2016) trabalharam com a hidrólise da caseína caprina por meio de diferentes tratamentos enzimáticos com tripsina e ficina e obtiveram resultados semelhantes para a inibição da *Escherichia coli* (ATCC 8739) e do *Bacillus cereus* (ATCC 11788) com atividades máximas de  $69,82\% \pm 5,87$  e  $51,53\% \pm 3,34$  no *pool* de hidrolisados com concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Já Aguilar-Toalá et al. (2017) obtiveram taxas de sobrevivência para as bactérias *Staphylococcus*

*aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Listeria innocua* 33090 de 54,41%±2,87, 67,54%±2,12 e 72,76%±1,34, respectivamente no *pool* de hidrolisados < 3 kDa de caseína, obtidos a partir das proteases produzidas por *Lactobacillus plantarum*.

### **3.4. Atividade antioxidante total**

#### **3.4.1. Atividade sequestradora de radicais ABTS<sup>•+</sup> e DPPH**

A avaliação da atividade sequestradora de radicais mostrou maior eficiência dos peptídeos na eliminação do radical livre ABTS<sup>•+</sup> em comparação ao DPPH no *pool* de hidrolisados em função do tempo (Figura 4A). O ensaio de 24 horas foi estatisticamente diferente dos demais, porém, após as oito horas de hidrólise a atividade antioxidante do ABTS<sup>•+</sup> foi superior aos 80%. Não houveram variações para a atividade de eliminação do radical DPPH ao longo do tempo de hidrólise, permanecendo com um potencial de sequestro do radical em 24% o que fez com que não houvessem diferenças significativas entre os ensaios. A atividade antioxidante equivalente ao trolox (EQT) e equivalente ao ácido ascórbico (EQAA) mostrada na Figura 4B, foi calculada de acordo com a curva padrão de cada atividade sequestradora de radicais livres e mostra uma EQT para o ABTS, superior aos 400  $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$  após as 8 horas de hidrólise. Já a EQAA para o DPPH teve um valor máximo de 21,82±0,18  $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$  em uma curva com máxima de 100  $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Para as cinco frações < 3 kDa provenientes do ensaio de 12 horas, separadas no FPLC, a maior atividade ocorreu na fração P2 (Figura 4C) tanto na eliminação do ABTS<sup>•+</sup> (81,42%±0,38), quanto na do DPPH (68,39%±0,54). As demais frações apresentaram atividade superior a 50% para o ABTS e a 40% para o DPPH. Com relação à atividade equivalente, os resultados acima de 350  $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$  de EQT foram observados nas frações P2, P3 e P4 e para a EQAA todas as frações foram superiores na equivalência em comparação a análise dos hidrolisados em função do tempo, com máxima de 72,64±0,59  $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 4D).

Corrêa et al. (2014) avaliaram a capacidade de peptídeos provenientes da hidrólise do soro do queijo de ovelha no sequestro de radicais e observaram que a capacidade de eliminação do ABTS<sup>•+</sup> foi crescente em função do tempo, com valores máximos após 6 h de hidrólise (51,30%). Ahmed et al. (2015) observaram atividade de eliminação do radical DPPH a partir de peptídeos provenientes de proteínas do leite caprino, hidrolisadas com pepsina. Já Luo et al. (2014) observaram que os

peptídeos provenientes de hidrolisados de caseína bovina apresentaram menor capacidade de eliminação do radical DPPH em apenas 30 minutos de reação, dessa forma, realizaram um estudo do tempo de incubação e concluíram que, após 24 h os hidrolisados apresentaram maior taxa no sequestro do radical. Estes resultados sugerem que caseínas e seus hidrolisados têm capacidade limitada para doar elétrons em um curto intervalo de interação da amostra com este radical.

### **3.4.2. Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC)**

Neste método foi avaliada a capacidade de eliminação de moléculas oxidativas como os radicais peroxila, gerados pelo AAPH a partir da degradação oxidativa da fluoresceína. Esta reação foi mensurada como a área sob a curva de decaimento (AUC), como apresentado por Ou et al. (2001). A capacidade de eliminação dos radicais peroxila aumentou ao longo do tempo até as 12 horas de hidrólise (Figura 5A). Após as 5 horas, pode-se observar uma atividade superior a  $1,0 \mu\text{mol TE}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$ , com máxima de  $1,83\pm 0,03 \mu\text{mol TE}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$  no ensaio de 12 horas que foi estatisticamente diferente dos demais. Já para as frações separadas  $< 3 \text{ kDa}$ , provenientes do ensaio de hidrólise de 12 horas, foi constatada maior capacidade de eliminação na amostra P2 (Figura 5B), que apresentou atividade máxima de  $1,29\pm 0,02 \mu\text{mol TE}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$ , com diferença estatística entre as outras frações. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Di Pierro et al. (2014), que avaliaram a atividade sequestradora de radicais oxigênio a partir da hidrólise do caseinato de sódio bovino com proteases vegetais provenientes do látex da *Ficus carica L.* durante 4 horas, e obtiveram atividade máxima de  $1,18 \mu\text{mol Trolox}\cdot\text{mg}^{-1}$  apenas a partir da hidrólise da fração  $\beta$ -caseína. Moreno-Montoro et al. (2017) trabalharam com peptídeos provenientes da hidrólise do leite de cabra fermentado e obtiveram atividade máxima entorno de  $1,0 \mu\text{mol TEAC}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$  nas frações de peptídeos  $< 3 \text{ kDa}$ , o que foi inferior aos resultados obtidos neste estudo. Já Wang, Xie e Li (2016), avaliaram a capacidade antioxidante em termos de ORAC de peptídeos derivados de caseína após ensaios de biodisponibilidade e a absorção destes peptídeos por células Caco-2 e obtiveram atividade máxima em torno de  $2,0 \mu\text{mol de TE}\cdot\text{mg}^{-1}$ .

### **3.4.3. Atividade quelante dos íons metálicos**

A atividade quelante de íons metálicos de transição como o  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  é responsável pelo atraso no processo de peroxidação lipídica, o que impede, as alterações no sabor dos alimentos com o passar do tempo, alterações nutricionais e retardo do processo de deterioração alimentar (ZHANG; LI; ZHOU, 2010). Os estudos da complexação de íons metálicos como  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  são realizados como mecanismos indiretos de atividade antioxidante, uma vez que, após a complexação destes metais, as reações que envolvem a formação de radicais oxidativos são inibidas, o que retarda o processo de oxidação. Como exemplo, a presença destes íons estimulam a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), como os radicais hidroxila ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) formados pela reação de Fenton e no caso específico do  $\text{Fe}^{2+}$  pela reação de Haber-Weiss na presença de ânions superperóxidos (CANABADY-ROCHELLE et al., 2018).

Neste trabalho, foi obtida maior taxa de atividade quelante após as 24 horas de hidrólise (Tabela 5) tanto para o  $\text{Cu}^{2+}$  ( $55,18\% \pm 0,41$ ), quanto para o  $\text{Fe}^{2+}$  ( $81,95\% \pm 1,05$ ), com resultados que diferiram estatisticamente dos demais. Os tempos de hidrólise de 1 hora e 3 horas não apresentaram diferença estatística entre si para a atividade quelante de  $\text{Cu}^{2+}$ . Desta forma, pode-se concluir que não houve influência do GH na atividade entre estes tempos. Diferentemente do que ocorreu na atividade quelante de  $\text{Fe}^{2+}$ , que apresentou diferenças estatísticas entre todos os ensaios.

A análise das atividades de complexação das amostras < 3 kDa provenientes do ensaio de 12 horas (Tabela 5), revelou que a fração P1 foi estatisticamente diferente das demais e apresentou o maior resultado de quelação para o  $\text{Cu}^{2+}$ , já para o  $\text{Fe}^{2+}$  as frações que apresentaram maiores resultados (P1, P3 e P5), não foram estatisticamente diferentes entre si. Pode-se observar também que as amostras foram mais eficientes na atividade quelante de  $\text{Fe}^{2+}$  com todos os resultados acima dos 50%.

Li e Zhao (2011) avaliaram a eficiência da atividade quelante do  $\text{Fe}^{2+}$  em função da variação nas concentrações de  $\text{FeCl}_2$ , a partir de hidrolisados de caseína. Estes autores utilizaram o dobro da concentração final de proteína do presente trabalho em sua reação e obtiveram atividade máxima entorno de 65%. Ou seja, os peptídeos gerados na hidrólise da caseína caprina pela protease do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848, foram mais eficientes na complexação do  $\text{Fe}^{2+}$ .

### **3.5. Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensiva (ECA)**

Os testes de inibição da ACE pelos peptídeos gerados a partir da hidrólise do caseinato caprino através da protease utilizada no presente trabalho, revelaram um grande potencial de atividade inibitória contra esta enzima como mostra a Figura 6A. A atividade aumentou com o passar do tempo de hidrólise até as 12 horas e apresentou máxima atividade de  $83,42\% \pm 0,40$ . Em 24 horas, o potencial de inibição caiu significativamente para  $39,42\% \pm 2,18$ , isto pode ter ocorrido devido à ação de degradação da protease nas sequências peptídicas com potencial de inibição. Estes resultados são semelhantes aos encontrados na literatura. Ibrahim, Ahmed e Miyata (2017), que hidrolisaram a caseína caprina com pepsina comercial e obtiveram atividade de inibição contra a ECA em torno de 80% no *pool* de hidrolisados. Já, Wu et al. (2013) trabalharam com hidrolisados da caseína bovina e apresentaram resultados máximos de atividade anti-hipertensiva de  $82,35\% \pm 2,71$  para hidrolisados da fração  $\alpha_{s2}$ - caseína.

Todas as frações separadas do ensaio de 12 horas apresentaram resultados superiores aos 55%, com destaque para a fração P3 que desempenhou maior atividade de inibição da ECA ( $87,77\% \pm 1,57$ ) e diferiu estatisticamente das demais (Figura 6B). As frações P2 e P5 apresentaram resultados de inibição superiores aos 70%, entretanto, foram estatisticamente diferentes. Na análise do  $IC_{50}$  das frações (Tabela 6), pode-se observar uma variação entre  $125,38 \pm 1,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (P4) e  $22,97 \pm 0,17 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (P5). Esta variação encontra-se dentro do que é relatado na literatura. Tagliazucchi et al. (2016) estudaram o potencial de inibição da ECA das proteínas do leite caprino hidrolisadas a partir do processo de digestão *in vitro*, separaram 9 frações por HPCL e obtiveram  $IC_{50}$  entre  $1156,3 \pm 10,5$  e  $14,1 \pm 0,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Espejo-Carpio et al. (2016) avaliaram também a hidrólise de proteínas do leite caprino no processo de digestão *in vitro* a partir de diferentes combinações de proteases e observaram uma variação no  $IC_{50}$  entre  $399,8 \pm 15,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $212,0 \pm 12,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Já Abdel-Hamid et al. (2017) apresentaram resultados de  $IC_{50}$  que variaram entre  $9,1 \pm 3,7$  a  $49,1 \pm 9,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  a partir da hidrólise do leite de búfala.

### **3.6. Avaliação do processo de digestão *in vitro* sob as atividades biológicas**

Após o processo de digestão *in vitro*, pode-se observar as atividades biológicas residuais do *pool* de peptídeos < 3 kDa, provenientes do ensaio de 12 horas, na Tabela 7. De forma geral, não houveram alterações significativas entre a amostra não digerida

(Tabela 3) e a saliva, conseqüentemente, pode-se constatar que a  $\alpha$ -amilase não apresentou efeitos sobre os peptídeos bioativos. Para a atividade antimicrobiana, pode-se observar que ao final do processo de digestão *in vitro* a amostra continuou com capacidade de inibir o crescimento de todas as bactérias, entretanto, o potencial de inibição foi reduzido na maioria dos micro-organismos com exceção apenas da *Listeria monocytogenes* (ESB 3572) que continuou sendo inibida de forma estável do começo ao fim do ensaio. Houve uma redução em torno de 15% do potencial antimicrobiano do *pool* de peptídeos frente as bactérias *Staphylococcus aureus* metilino-sensível (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145).

Gough et al. (2017) avaliaram a resistência da nisina, um dos peptídeos mais conhecidos com atividade antimicrobiana, frente ao processo de digestão gastrointestinal e também observaram redução dessa atividade principalmente no ensaio com pancreatina. Isto constata que a nisina apresenta maior degradação no intestino delgado. Já, Almaas et al. (2011) hidrolisaram a caseína com proteases provenientes do suco gastrointestinal humano durante 10 horas e obtiveram atividade antimicrobiana para *Escherichia coli* (27%), *Bacillus cereus* (44%) e *Listeria monocytogenes* (38%).

Na avaliação da atividade antioxidante total pode-se concluir que o processo de digestão *in vitro* gerou alterações no perfil peptídico do *pool* de hidrolisados, entretanto, estas alterações foram positivas. Uma vez que, a capacidade dos peptídeos em sequestrar o radical ABTS<sup>•+</sup> não foi afetada e permaneceu acima dos 90% ao longo de todo ensaio, com atividade máxima de  $96,86\% \pm 0,42$ . Dessa forma, não houve interferências significativas nem da saliva, nem das proteases presentes no trato gastrointestinal. Já para o DPPH, a pepsina foi responsável por um aumento considerável de 17,91% na atividade de sequestro deste radical após os 120 minutos, no entanto, esse incremento foi perdido com o passar do tempo da digestão intestinal e finalizou com um aumento de 4,91%.

O teste de ORAC revelou que a capacidade dos peptídeos em absorver radicais de oxigênio aumentou ao longo do tempo e passou de  $1,88 \pm 0,02$  para máxima atividade de  $2,27 \pm 0,02 \mu\text{mol TE} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ , após os 120 minutos da digestão intestinal. O potencial quelante dos peptídeos frente aos íons metálicos  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  não foi afetado de forma significativa e as atividades variaram entre  $45,96\% \pm 0,35$  (inicial) e  $47,22\% \pm 0,45$  (final) para o  $\text{Cu}^{2+}$  e para o  $\text{Fe}^{2+}$  entre  $71,35\% \pm 2,24$  (inicial) e  $66,75\% \pm 2,43$  (final). Chen e Li (2012) avaliaram a capacidade antioxidante de

hidrolisados de caseína após ensaios de simulação da digestão gastrointestinal e observaram que o potencial bioativo tanto para a atividade de sequestro do radical ABTS<sup>•+</sup>, quanto para a atividade do ORAC, diminuiu ao passar do tempo dos ensaios de digestão, no entanto, algumas frações foram mais resistentes que outras e apresentaram uma perda menor do potencial de atividade antioxidante total.

A capacidade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) permaneceu acima dos 75% de atividade mesmo com uma redução de 9,88% ao longo do ensaio de digestão. Isso mostrou que as proteases presentes no trato gastrointestinal foram capazes de degradar alguns peptídeos que agem contra a ECA, mas, o *pool* de peptídeos continuou eficiente para esta atividade e é capaz de agir no processo de controle da pressão arterial caso estes peptídeos sejam absorvidos pelo organismo.

Resultados semelhantes foram observados por Petrat-Melin et al. (2015), que avaliaram a resistência de frações peptídicas provenientes da hidrólise da caseína, e obtiveram atividade inibitória da ECA em torno de 70% após 120 minutos de digestão. Já Contreras et al. (2013), submetem sequências de aminoácidos conhecidas, derivadas da caseína, à simulação da digestão gastrointestinal e avaliaram a resistência da atividade anti-hipertensiva destes peptídeos. Estes autores observaram que algumas sequências perderam parte do seu potencial de inibição e outras aumentaram a atividade inibidora da ECA. Ou seja, o processo de digestão gastrointestinal pode influenciar de forma positiva ou negativa a inibição da ECA através da degradação de alguns aminoácidos.

### **3.7. Cromatografia de exclusão molecular**

O procedimento de cromatografia de exclusão molecular do *pool* de peptídeos < 3 kDa provenientes do ensaio de 12 horas, em sistema FPLC, foi capaz de separar frações com picos bem definidos, portanto, a coluna utilizada apresentou uma alta resolução para a separação das moléculas de acordo com sua massa molecular, como mostra a Figura 7A. Um total de cinco frações foi coletado (P1, P2, P3, P4 e P5) para a realização das atividades biológicas, bem como para o sequenciamento aminoacídico por espectrometria de massa em MALDI-TOF/TOF. Já, na Figura 7B, pode-se observar as alterações geradas pelo processo de digestão *in vitro* no perfil peptídico deste mesmo *pool* de hidrolisados, com destaque para a degradação que

ocorreu principalmente nos peptídeos com maior massa molecular, ou seja, aqueles que são eluídos primeiro.

### 3.8. Espectrometria de massa

Foram realizadas as análises por MALDI-TOF/TOF de todas as frações < 3 kDa, separadas em FPLC a partir do *pool* de hidrolisados de mesma massa molecular, obtidos no ensaio de 12 horas de hidrólise do caseínato caprino. A identificação da sequência de aminoácidos por PMF-MS/MS foi realizada com confiabilidade >95%, e levou em consideração os peptídeos mais predominantes, ou seja, com maior intensidade nos espectros de massa de cada fração. Um total de 47 peptídeos foram identificadas para todas as frações, com uma média de 10 peptídeos para cada, como pode ser observado na Tabela 8. A busca pelas sequências no banco de dados BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>) revelou que a maioria das sequências ainda não foram relatadas na literatura.

Silva, Sarmiento e Pintado (2013) relataram que grande parte dos peptídeos com atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, apresenta uma característica de se associar com cargas aniônicas das proteoglicanas presentes na parede celular e portanto, denominados de peptídeos aniônicos. Segundo Yount e Yeaman (2013), as bactérias Gram-positivas apresentam várias camadas de proteoglicanas, intercaladas com ácido teicóico e lipoteicóico o que confere esta característica de carga negativa.

A composição, estrutura e grau de hidrofobicidade das sequências de peptídeos, levam as diferenças nas atividades biológicas e suas intensidades. As propriedades antioxidantes estão relacionadas principalmente com aminoácidos como Tyr (Y), Trp (W), Met (M), Lys (L), Cys (C) e His (H). Dessa forma, os aminoácidos com resíduos aromáticos podem atuar como doadores de prótons em radicais deficientes em elétrons, o que confere, propriedades de eliminação de radicais, especialmente quando estão no terminal carboxila (Sarmadi e Ismail, 2010). Todos os peptídeos identificados apresentaram alguns destes aminoácidos em sua estrutura, localizados principalmente no terminal carboxila.

Já para a atividade anti-hipertensiva, foi demonstrado que a inibição da ECA é mais eficaz quando há presença de aminoácidos como Tyr (Y), Phe (F), Trp (W), Pro (P), Ileu (I) e Val (V), além de resíduos de Leu (L), que aumentam significativamente o processo de inibição da ECA. Dados da literatura demonstram ainda que o potencial

positivo de resíduos de Arg (R) e Lys (K) também contribuem para potencializar este efeito inibidor (HERNÁNDEZ-LEDESMA; CONTRERAS; RECIO, 2011). Desta forma, pode-se observar neste trabalho que há a presença de várias sequências com estes resíduos de aminoácidos em sua composição, o que provavelmente conferiu os resultados expressivos de inibição da ECA.

#### 4. CONCLUSÃO

A utilização de planejamento estatístico fatorial  $2^3$  é eficiente para avaliar a forma com que os parâmetros testados influenciam na hidrólise da caseína caprina pela serina protease produzida pelo fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848, o que confere um aumento considerável no GH. Os peptídeos liberados apresentam potencial para todas as atividades biológicas avaliadas, com destaque para as atividades antioxidantes e principalmente anti-hipertensiva. Os testes de digestão *in vitro* proporcionam um melhor entendimento sobre a resistência destes peptídeos frente as enzimas proteolíticas presentes no trato gastro intestinal. A identificação da sequência aminoácida por espectrometria de massas permite a identificação confiável dos peptídeos, muitos deles ainda não catalogados nos bancos de dados específicos.

#### 5. REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMID, M.; OTTE, J.; DE GOBBA, C.; OSMAN, A.; HAMAD, E. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidante capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 66, p. 91-98, 2017.

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, p. 1256-1262, 1979.

AGUILAR-TOALÁ, J. E.; SANTIAGO-LÓPEZ, L.; PERES, C. M.; PERES, C.; GARCIA, H. S.; VALLEJO-CORDOBA, B.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 65-75, 2017.

AHMED, A. S.; EL-BASSIONY, T.; ELMALT, L. M.; IBRAHIM H. R. Identification of potente antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. **Food Research International**, v. 74, p. 80-88, 2015.

ALMAAS, H.; ERIKSEN, E.; SEKSE, C.; COMI, I.; FLENGSRUD, R.; HOLM, H.; JENSEN, E.; JACOBSEN, M.; LANGSRUD, T.; VEGARUD, G. E. Antibacterial peptides derived from caprine whey proteins, by digestion with human gastrointestinal juice. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. 896-905, 2011.

ASOODEH, A.; YAZDI, M. M.; CHAMANI, J. Purification and characterisation of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from lysozyme hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 131, p. 291–295, 2012.

BALTI, R.; BOUGATEF, A.; SILA, A.; GUILLOCHON, D.; DHULSTER, P.; NEDJAR-ARROUME, N. Temporary removal: Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potente active peptide in spontaneously hypertensive rats. **Food Chemistry**, v. 170, p. 519–525, 2015.

BEZERRA, V. S.; CAMPOS, J. F.; SILVA, R. A.; PORTO, T. S.; LIMA FILHO, J. F., PORTO, A. L. F. Biotechnological richness of the northeastern semi-arid region: antioxidant activity of casein hydrolysates from Moxotó goat milk (*Capra hircus Linnaeus*, 1758) obtained by papain action. **Food Science and Technology**, v. 33, p. 513-520, 2013.

BOUGHERRA, F.; DILMI-BOURAS, A.; BALTI, R.; PRZYBYLSKI, R.; ADOUI, F.; ELHAMEUR, H.; CHEVALIER, M.; FLAHAUT, C.; DHULSTER, P.; NAIMA, N. Antibacterial activity of new peptide from bovine casein hydrolyzed by a serine metalloprotease of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* BR16. **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 112-122, 2017.

BROGDEN, N. K.; BROGDEN, K. A. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 217– 225, 2011.

CANABADY-ROCHELLE, L. L. S.; SELMECZI, K.; COLLIN, S.; PASC, A.; MUHR, L.; BOSCHI-MULLER, S. SPR screening of metal chelating peptides in a hydrolysate for their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 239, p. 478-485, 2018.

CHEN, M.; LI, B. The effect of molecular weights on the survivability of casein-derived antioxidant peptides after the simulated gastrointestinal digestion. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 341-338, 2012.

CONTRERAS, M. D. M.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, L.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; RECIO, I. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 9–15, 2011.

CONTRERAS, M. M.; SANCHEZ, D.; SEVILLA, M. A.; RECIO, I.; AMIGO, L. Resistance of casein-derived bioactive peptides to simulated gastrointestinal digestion. **International Dairy Journal**, v. 32, p. 71-78, 2013.

CORRÊA, A. P. F.; DAROIT D. J.; FONTOURA, R.; MEIRA S. M. M. SEGALINA J., BRANDELLI A. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides

with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. **Peptides**, v. 61, p. 48-55, 2014.

COSTA, E. L.; GONTIJO, J. A. R.; NETTO, F. M. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 632–640, 2007.

DI PIERRO, G., O'KEEFFE, M. B.; POYARKOV, A.; LOMOLINO, G.; FITZGERALD, R. J. Antioxidant activity of bovine casein hydrolysates produced by *Ficus carica* L.-derived proteínase. **Food Chemistry**, v. 156, p. 305-311, 2014.

EGITO, A. S.; GIRARDET, J. M.; LAGUNA, L. E.; POIRSON, C.; MOLLÉ, D.; MICLO, L.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L. Milk – clotting activity of enzyme extracts from sunflower and *albizia* seeds and specific hydrolysis of bovine k- casein. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 816-825, 2007.

EGITO, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; LAGUNA, L. E.; MICLO, L.; GIRARDER, J. M.; GAILLARD, J. L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 932-939, 2006.

ELZOGHBY, A. O.; EL-FOTOH, W. S. A.; ELGINDY, N. A. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 153, p. 206–216, 2011.

ESMAEILPOUR, M.; EHSANI, M. R.; AMINLARI, M.; SHEKARFOROUSH, S.; HOSEINI, E. Antimicrobial activity of peptides derived from enzymatic hydrolysis of goat milk caseins. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, p. 599-605, 2016.

ESPEJO-CARPIO, F. J.; GARCÍA-MORENO, P. J.; PEREZ-GALVEZ, R.; MORALES-MEDINA, R.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M. Effect of digestive enzymes on the bioactive properties of goat milk protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v. 54, p. 21-28, 2016.

GOUGH, R.; O'CONNOR, P. M.; REA, M. C.; GOMEZ-SALA, B.; MIAO, S.; HILL, C.; BRODKORB, A. Simulated gastrointestinal digestion of nisin and interaction between nisin and bile. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, p. 530-537, 2017.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; CONTRERAS, M. D. M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, n. 1, p. 23–35, 2011.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; GARCÍA-NEBOT, M. J.; FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; AMIGO, L.; RECIO, I. Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. **International Dairy Journal**, v. 38, n. 2, p. 82–100, 2014.

IBRAHIM, H. R.; AHMED, A. S.; MIYATA, T. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. **Journal of Advanced Research**, v. 8, p. 63-71, 2017.

KADRI, A.; CHOBBA, I. B.; ZARAI, Z.; BÉKIR, A.; GHARSALLAH, N.; DAMAK, M.; GDOURA, R. Chemical constituents and antioxidant activity of the essential oil from aerial parts of *Artemisia herba-alba* grown in Tunisian semi-arid region. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 2923–2929, 2011.

KIM, G.; JANG, H.; KIM, C. Antioxidant capacity of caseinophosphopeptides prepared from sodium caseinate using alcalase. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1359–1365, 2007.

LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; KELLN, R. A. The Relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 76, p. 103-122, 1973.

LI, D.; ZHAO, X. H., Glutaminase-induced deamidation and hydrolysis of casein and metal-chelating or ACE-inhibitory activity of the hydrolysates *in vitro*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 324–332, 2011.

LI, Z.; JIANG, A.; YUE, T.; WANG, J.; SU, J. Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hidrolisates. **Jounal Dairy of Science**. v. 96, p. 4242-4251, 2013.

LIRA, T. B. F.; BEZERRA, V. S.; SILVA, F. O.; DIAS, G. M. P.; LIMA FILHO, J. L.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F. Avaliação de variáveis que influenciam a hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra Moxotó. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 1036-1043, 2010.

LUO, Y.; PAN, K.; ZHONG, Q. Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: Partial characterizations. **Food Chemistry**, v. 15, p. 5146-5154, 2014.

MINE, Y.; MA, F.; LAURIAU, S. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1088-1094, 2004.

MORENO-MONTORO, M.; OLALLA-HERRERA, M.; RUFÍAN-HENARES, J. A.; MARTÍNEZ, R. G.; MIRALLES, B.; BERGILLOS, T.; NAVARRO-ALARCÓN, M.; JAUREGI, P. Antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial activity of fermented goat milk: activity and physicochemical property relationship of the peptide componentes. **Food & Function**, v. 8, n. 8, p. 2783-2791, 2017.

NAIR, P. K.; ALEXANDER, M.; DALGLEISH, D.; CORREDIG, M. Physico-chemical properties of casein micelles in unheated skim milk concentrated by osmotic stressing: Interactions and changes in the composition of the serum phase. **Food Hydrocolloids**, v. 34, p. 46-53, 2014.

NAKAMURA, Y.; YAMAMOTO, N.; SAKAI, K.; OKUBO, A.; YAMAZAKI, S.; TAKANO, T. Purification and characterization of antiotensin-I-converting enzyme inhibitors from sour milk. **JournalofDairy Science**, v. 78, p. 777-783, 1995.

PETRAT-MELIN, B.; ANDERSEN, P.; RASMUSSEN, J. T.; POULSEN, N. A.; LARSEN, L. B.; YOUNG, J. F. *In vitro* digestion of purified  $\beta$ -casein variants A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, B,

and I: effects on antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory capacity. **Journal Dairy of Science**, v. 98, p. 15-26, 2015.

PHELAN, M.; AHERNE, A.; FITZGERALD, R. J.; O'BRIEN, M. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 643–654, 2009.

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

SÁNCHEZ-VIOQUE, R.; POLISSIOU, M.; ASTRAKA, K.; MOZOS-PASCUAL, M.; TARANTILIS, P.; HERRAIZ-PEÑALVER, D.; SANTANA-MÉRIDAS, O. Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 150-159, 2013.

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

SCHÄGGER, H.; JAGOW, G. V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p. 368-379, 1987.

SILVA, N. C.; SARMENTO, B.; PINTADO, M. The importance of antimicrobial peptides and their potential for therapeutic use in ophthalmology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, p. 5–10, 2013.

SILVA, S. V.; MALCATA, F. X. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1–15, 2005.

SU, R.; LIANG, M.; QI, W.; LIU, R.; YUAN, S.; HE, Z. Pancreatic hydrolysis of bovine casein: Peptide release and time-dependent reaction behavior. **Food Chemistry**, v. 133, p. 851–858, 2012.

TAGLIAZUCCHI, D.; SHAMSIA, S.; HELAL, A.; CONTE, A. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from goats' milk released by *in vitro* gastro-intestinal digestion. **International Dairy Journal**, v. 71, p. 6-16, 2017.

WANG, B.; XIE, N.; LI, B. Charge properties of peptides derived from casein affect their bioavailability and cytoprotection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 2468-2479, 2016.

WANG, C.; WANG, B.; LI, B. Bioavailability of peptides from casein hydrolysate *in vitro*: Amino acid compositions of peptides affect the antioxidant efficacy and resistance to intestinal peptidases. **Food Research International**, v. 81, p. 188-196, 2016.

WU, S.; QI, W.; LI, T.; LU, D.; SU, R.; HE, Z. Simultaneous production of multi functional peptides by pancreatic hydrolysis of bovine casein in an enzymatic membrane reactor via combinational chromatography. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2944–2951, 2013.

WU, Z.; PAN, D.; ZHEN, X.; CAO, J. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine casein and identified by MALDI-TOF-MS/MS. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 1331-1337, 2013.

XIE, N.; WANG, C.; AO, J.; LI, B. Non-gastrointestinal-hydrolysis enhances bioavailability and antioxidant efficacy of casein as compared with its *in vitro* gastrointestinal digest. **Food Research International**, v. 51, p. 114-122, 2013.

YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1277, p. 127–138, 2013.

ZHANG, L.; LI, J.; ZHOU K. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2084-2089, 2010.

## TABELAS

**Tabela 1** – Matriz do planejamento fatorial  $2^3$  para analisar os fatores de influência no grau de hidrólise (GH) da caseína caprina por protease purificada do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848.

Fatores	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Relação E/S	1:15	1:10	1:5
Temperatura (°C)	30	35	40
Tempo (h)	1	3	5

**Tabela 2** – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848 de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ .

FV	SQ	GL	QM	F-valor	p-valor
(1)Relação E/S	48,1786	1	48,1786	896,306	0,000082
(2)Temperatura (°C)	16,8801	1	16,8801	314,035	0,000392
(3)Tempo (h)	151,9212	1	151,9212	2826,317	0,000015
1 by 2	1,1949	1	1,1949	22,229	0,018066
1 by 3	17,5053	1	17,5053	325,665	0,000371
2 by 3	6,7643	1	6,7643	125,841	0,001519
Falta de Ajuste	1,9110	2	0,9555	17,776	0,021707
Erro Puro	0,1613	3	0,0538		
Total SQ	244,5166	11			

FV = Fontes de Variação; SQ = Soma dos Quadrados; GL = Graus de Liberdade; QM = Quadrado Médio.

**Tabela 3** – Atividade antimicrobiana em %, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina, em função do tempo. Concentração de 500 µg.mL<sup>-1</sup>.

Micro-organismos	Tempo (horas)					
	1	3	5	8	12	24
<i>S. aureus</i> MR	52,8±2,2 <sup>d</sup>	56,3±0,9 <sup>d</sup>	70,3±0,2 <sup>c</sup>	78,2±0,5 <sup>b</sup>	84,3±0,7 <sup>a</sup>	81,4±2,5 <sup>a</sup>
<i>S. aureus</i> MS	48,7±4,8 <sup>e</sup>	55,2±1,9 <sup>d</sup>	59,4±1,6 <sup>cd</sup>	62,6±2,1 <sup>c</sup>	86,0±2,0 <sup>a</sup>	74,9±2,7 <sup>b</sup>
<i>B. cereus</i>	-	-	-	9,9±0,2 <sup>c</sup>	40,6±1,3 <sup>a</sup>	27,2±0,5 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	32,3±2,2 <sup>a</sup>	29,7±1,7 <sup>a</sup>
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	15,7±0,3 <sup>c</sup>	16,4±0,1 <sup>c</sup>	55,4±1,6 <sup>a</sup>	46,1±0,4 <sup>b</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	3,6±0,9 <sup>d</sup>	21,2±1,0 <sup>c</sup>	62,6±1,0 <sup>a</sup>	51,9±0,9 <sup>b</sup>

MR: metilino-resistente. MS: metilino-sensível.

**Tabela 4** – Atividade antimicrobiana em %, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise. Concentração de 500 µg.mL<sup>-1</sup>.

Micro-organismo	Fração				
	P1	P2	P3	P4	P5
<i>S. aureus</i> MR	58,87±0,59	85,27±1,47	48,56±2,53	70,69±2,17	70,74±0,22
<i>S. aureus</i> MS	52,77±5,33	84,66±2,86	33,35±3,96	54,28±4,46	67,07±2,99
<i>B. cereus</i>	-	-	-	33,27±2,24	14,92±1,90
<i>E. coli</i>	-	21,45±1,18	-	26,90±2,35	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	21,52±1,24	35,08±1,06	20,17±1,91	-
<i>L. monocytogenes</i>	-	17,52±2,55	60,04±1,01	39,39±1,11	19,31±0,39

MR: metilino-resistente. MS: metilino-sensível.

**Tabela 5** – Atividade quelante de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  em %, dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina e das frações (< 3 kDa) de peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise. Concentração de  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Tempo (h)	Quelante de $\text{Cu}^{2+}$	Quelante de $\text{Fe}^{2+}$	Fração	Quelante de $\text{Cu}^{2+}$	Quelante de $\text{Fe}^{2+}$
1	12,43±0,37 <sup>e</sup>	28,92±0,52 <sup>f</sup>	P1	38,01±0,56 <sup>a</sup>	60,26±1,98 <sup>a</sup>
3	14,62±0,41 <sup>e</sup>	35,09±1,27 <sup>e</sup>	P2	21,04±0,80 <sup>d</sup>	53,97±2,5 <sup>b</sup>
5	25,31±0,22 <sup>d</sup>	49,73±0,94 <sup>d</sup>	P3	25,76±0,64 <sup>c</sup>	59,74±2,19 <sup>a</sup>
8	34,59±0,18 <sup>c</sup>	60,27±1,64 <sup>c</sup>	P4	25,33±0,48 <sup>c</sup>	52,75±1,81 <sup>b</sup>
12	47,83±0,71 <sup>b</sup>	74,53±1,92 <sup>b</sup>	P5	28,47±0,75 <sup>b</sup>	60,91±2,03 <sup>a</sup>
24	55,18±0,41 <sup>a</sup>	81,95±1,05 <sup>a</sup>			

**Tabela 6** –  $\text{IC}_{50}$  da atividade anti-hipertensiva das frações (< 3 kDa) de peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise.

Fração	$\text{IC}_{50} (\mu\text{g.mL}^{-1})$
P1	81,04±0,52
P2	51,65±0,97
P3	22,97±0,17
P4	125,38±1,03
P5	40,84±1,24

**Tabela 7** – Atividades biológicas residuais do *pool* de hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina, provenientes do ensaio de 12 horas, após o ensaio de digestão gastrointestinal.

Micro-organismo	Atividade Antimicrobiana (%)				
	Saliva	Digestão Gástrica		Digestão Intestinal	
	10 min.	60 min.	120 min	60 min.	120 min.
<i>S. aureus</i> MR	82,45±5,46	82,98±1,55	80,85±3,86	73,22±2,59	75,15±0,55
<i>S. aureus</i> MS	81,31±1,31	81,93±0,82	75,73±1,12	67,74±1,67	65,75±2,21
<i>B. cereus</i>	37,58±1,91	30,91±1,29	32,96±0,73	30,75±4,09	32,74±0,93
<i>E. coli</i>	27,20±0,49	31,73±1,46	25,94±2,24	25,69±1,03	20,07±3,72
<i>P. aeruginosa</i>	52,30±0,58	44,18±0,32	38,96±0,73	41,81±2,39	37,81±0,09
<i>L. monocytogenes</i>	59,71±0,71	52,15±0,29	55,15±0,55	52,52±1,71	53,94±2,24

	Atividade Antioxidante				
	Saliva	Digestão Gástrica		Digestão Intestinal	
	10 min.	60 min.	120 min	60 min.	120 min.
ABTS (%)	92,65±0,77	96,23±0,46	93,38±0,14	96,70±0,16	96,86±0,42
DPPH (%)	26,83±0,24	37,56±0,01	44,74±0,32	33,41±0,35	31,74±0,19
ORAC-FL*	1,88±0,02	1,97±0,07	2,18±0,01	2,22±0,04	2,27±0,02
Cu <sup>2+</sup> (%)	45,96±0,35	49,61±0,12	50,81±0,30	51,94±0,90	47,22±0,45
Fe <sup>2+</sup> (%)	71,35±2,24	77,23±1,09	74,15±1,67	69,40±1,72	66,75±2,43

	Atividade Anti-hipertensiva (%)				
	Saliva	Digestão Gástrica		Digestão Intestinal	
	10 min.	60 min.	120 min	60 min.	120 min.
	85,29±0,72	82,75±1,34	79,88±0,48	77,58±0,44	75,41±1,77

\*=  $\mu\text{mol de TE.mg de proteína}^{-1}$

**Tabela 8** – Peptídeos identificados por espectrometria de massa (MS/MS) das frações (< 3 kDa) provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise da caseína caprina.

Fração	Sequência	Massa Exp. (Da)	Massa Calc. (Da)	Fonte de Proteína
P1	RDMPIQAF	976,52	976,48	$\beta$ -caseína (196-203)
	SWMHQPPQP	1106,52	1106,50	$\beta$ -caseína (157-165)
	YQEPVLGPVR	1156,64	1156,62	$\beta$ -caseína (206-215)
	LPVPQKVVPRD	1374,76	1374,80	$\beta$ -caseína (186-197)
	ELNVVGETVESLS	1374,76	1374,69	$\beta$ -caseína (20-32)
	EMPFKYPVEPF	1479,74	1479,71	$\beta$ -caseína (123-134)
	YQEPVLGPVRGPF	1554,85	1554,82	$\beta$ -caseína (206-219)
	TDVEKLHLPLPLVQ	1600,93	1600,92	$\beta$ -caseína (143-156)
	THINKKIEKFQSE	1600,93	1600,86	$\beta$ -caseína (39-51)
	YQEPVLGPVRGPFPI	1667,94	1667,90	$\beta$ -caseína (206-220)
	RLNFLKKISQYYQ	1700,02	1699,94	$\alpha_{S2}$ -caseína (176-188)
TGPIPNLPLQNILPLTQTPVVV	2297,27	2297,30	$\beta$ -caseína (78-99)	
P2	VLPNTVPA	809,43	809,46	$\kappa$ -caseína (99-106)
	VLSRYPS	820,45	820,44	$\kappa$ -caseína (52-58)
	YYQQRPV	952,51	952,48	$\kappa$ -caseína (63-69)
	RHPHPHLS	979,54	979,51	$\kappa$ -caseína (118-125)
	HPHLSFMAI*	1067,54	1067,52	$\kappa$ -caseína (121-129)
	AQTLQWQVL	1085,58	1085,59	$\kappa$ -caseína (92-100)
	RSPAQTLQW	1085,58	1085,56	$\kappa$ -caseína (89-97)
	SFMAIPPKD	1132,58	1132,60	$\kappa$ -caseína (125-134)
	PFPKYPVEPF	1219,62	1219,63	$\beta$ -caseína (124-134)
	PHPHLSFMAIPPK*	1486,75	1486,78	$\kappa$ -caseína (120-131)
	SYGLNYYQQRPV	1486,75	1486,72	$\kappa$ -caseína (58-69)
CQDQPTTLARHPH	1502,74	1502,70	$\kappa$ -caseína (109-121)	
P3	HQPPQPL	815,46	815,43	$\beta$ -caseína (160-166)
	WDQVKR	830,46	830,44	$\alpha_{S2}$ -caseína (125-130)
	SWMHQPP	881,41	881,39	$\beta$ -caseína (157-163)
	MHQPPQPL	946,51	946,47	$\beta$ -caseína (159-166)
	NFLKKISQ	976,57	976,57	$\alpha_{S2}$ -caseína (178-185)
	YPYQGPIVL	1048,59	1048,56	$\alpha_{S2}$ -caseína (114-122)
	VMFPPQSVLS	1103,60	1103,57	$\beta$ -caseína (170-179)
	YQEPVLGPVR	1156,66	1156,62	$\beta$ -caseína (206-215)
PLTQTPVVVPPFLQP	1631,94	1631,93	$\beta$ -caseína (91-105)	

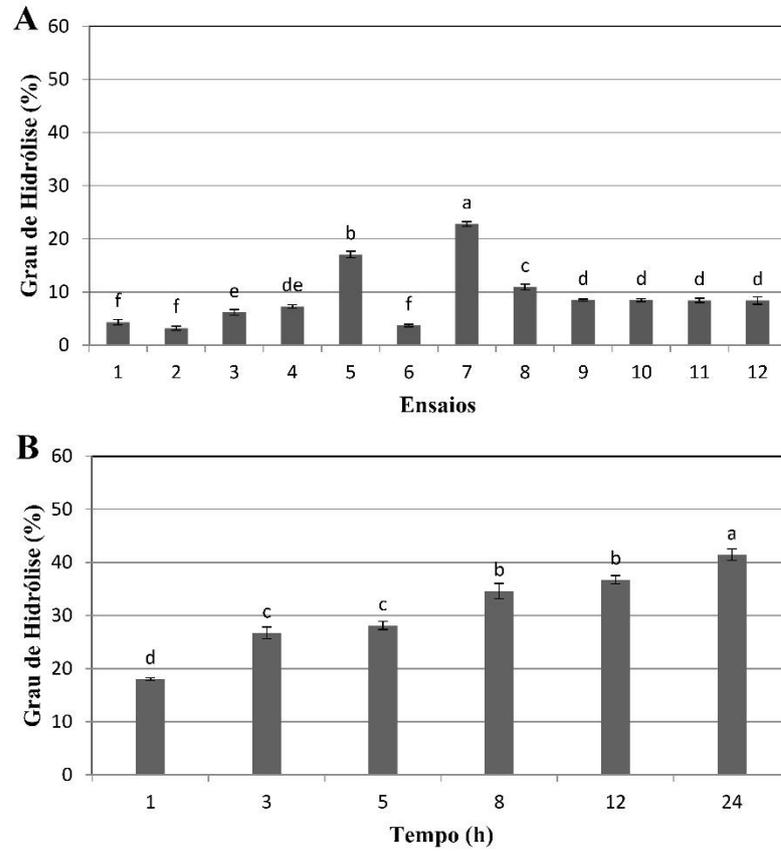
	QSLVYPFTGPIPNSL	1631,94	1631,86	$\beta$ -caseína (71-85)
P4	VMFPPQ	717,37	717,35	$\beta$ -caseína (170-175)
	SLTLTDV	747,41	747,40	$\beta$ -caseína (139-145)
	PNSLPQN	768,36	768,38	$\beta$ -caseína (82-88)
	RDMPIQA*	845,40	845,41	$\beta$ -caseína (196-202)
	ARHPHPHLS	1050,57	1050,55	$\kappa$ -caseína (117-125)
P5	TAQVTST	706,38	706,35	$\kappa$ -caseína (184-190)
	GPFTPTV	717,40	717,37	$\alpha_{S2}$ -caseína (133-139)
	KAGSSCQV	778,40	778,36	$\alpha_{S1}$ -caseína (76-83)
	RGPFPIL	798,48	798,48	$\beta$ -caseína (215-221)
	IRSSSEE	806,38	806,38	$\alpha_{S2}$ -caseína (70-76)
	MKAGSSCQ*	826,37	826,33	$\alpha_{S1}$ -caseína (75-82)
	NVVGETVE	845,43	845,41	$\beta$ -caseína (22-29)
	SWMHQPP	881,40	881,39	$\beta$ -caseína (157-163)

---

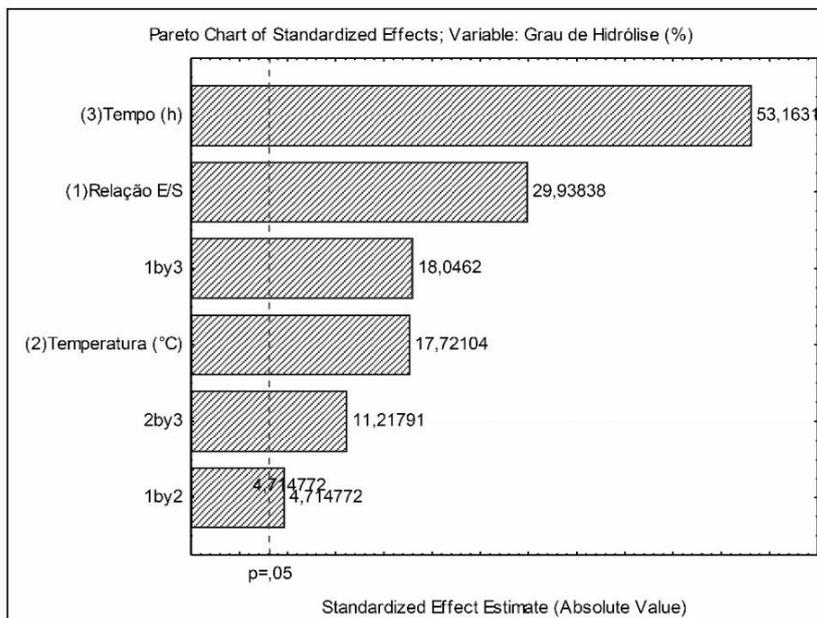
\* + Oxidação (M).

## FIGURAS

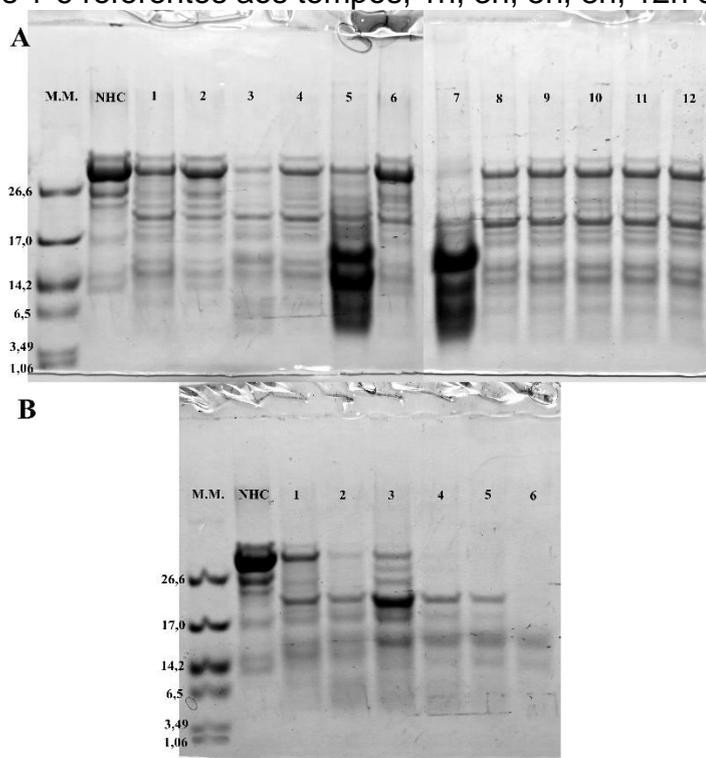
**Figura 1** – (A). Grau de hidrólise da caseína caprina no planejamento fatorial  $2^3$ . (B). Grau de hidrólise da caseína caprina a partir do ensaio 7 em função do tempo. As barras de erro representam o desvio padrão.



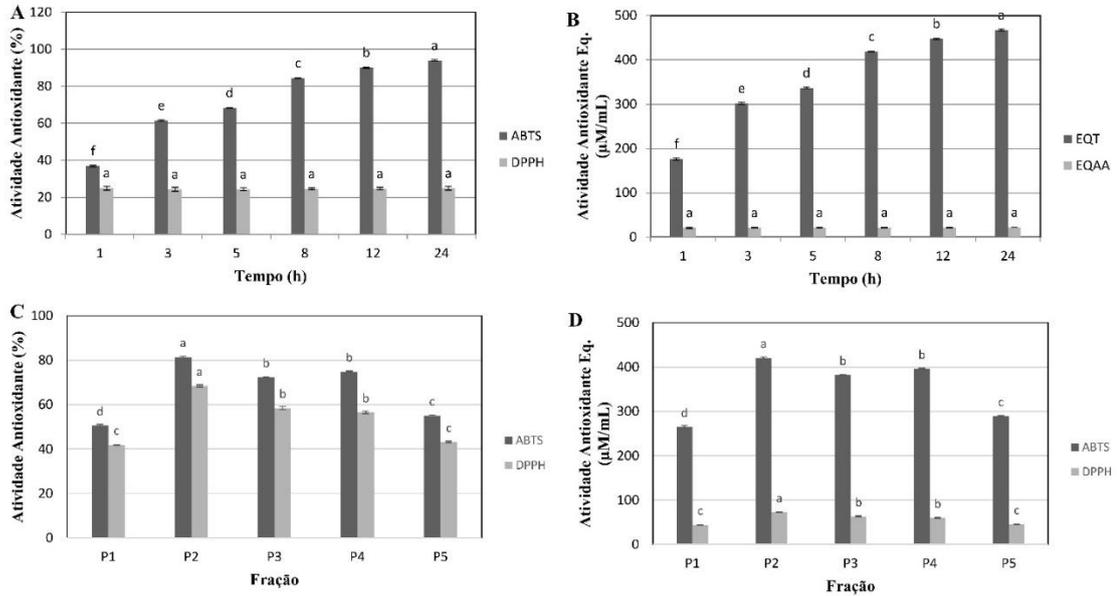
**Figura 2** – Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis no GH da caseína caprina hidrolisada pela protease purificada do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848 de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ .



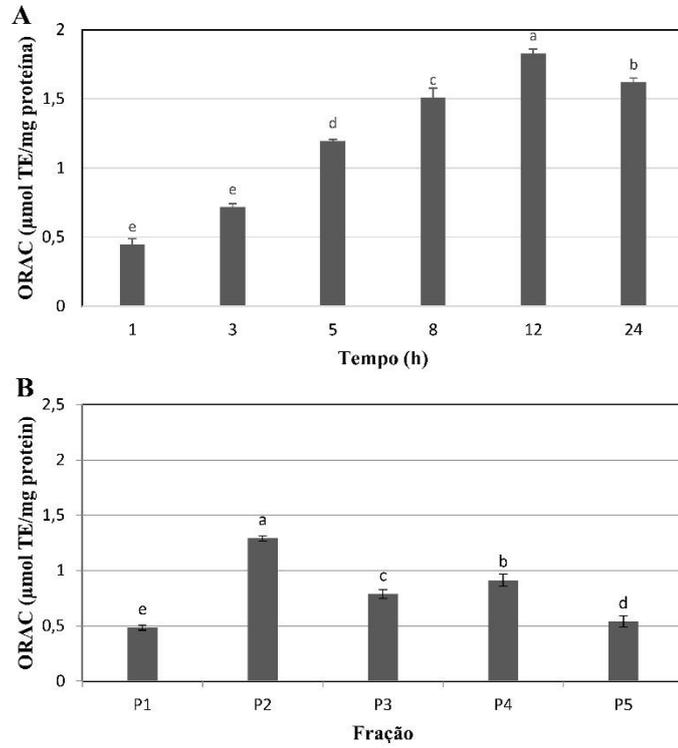
**Figura 3** – (A). Gel de Tricina-SDS-PAGE do planejamento fatorial  $2^3$  da caseína caprina hidrolisada, sendo os números 1-12 correspondentes aos seus respectivos ensaios, M.M.: Marcador Molecular e NHC: Caseína não hidrolisada. (B). Gel de Tricina-SDS-PAGE do ensaio 7 da hidrólise da caseína caprina em função do tempo, sendo os números 1-6 referentes aos tempos, 1h, 3h, 5h, 8h, 12h e 24h.



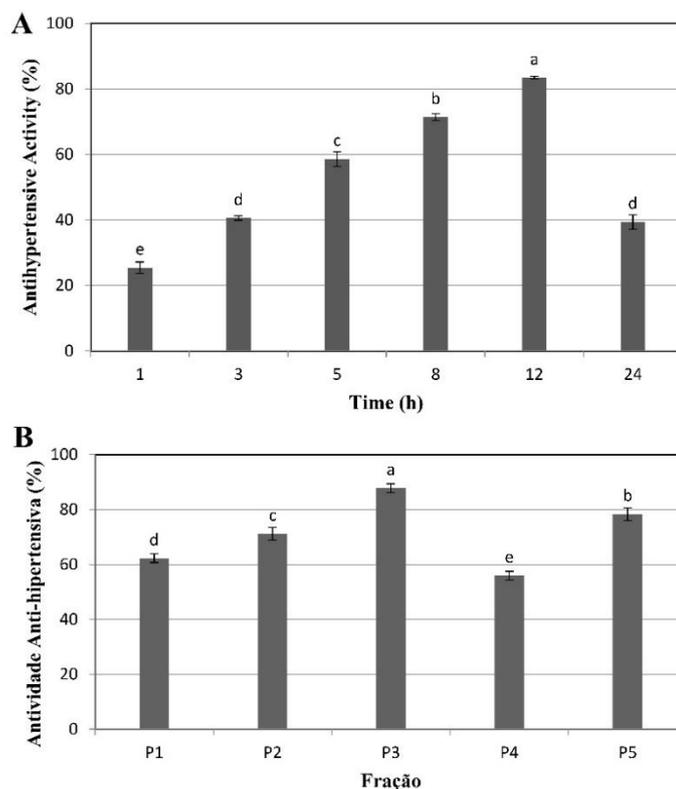
**Figura 4** – (A). Atividade antioxidante (%) do ABTS e DPPH dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (B). Atividade antioxidante Equivalente ( $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do ABTS e DPPH dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (C). Atividade antioxidante (%) do ABTS e DPPH das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas. (D). Atividade antioxidante Equivalente ( $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do ABTS e DPPH das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas.



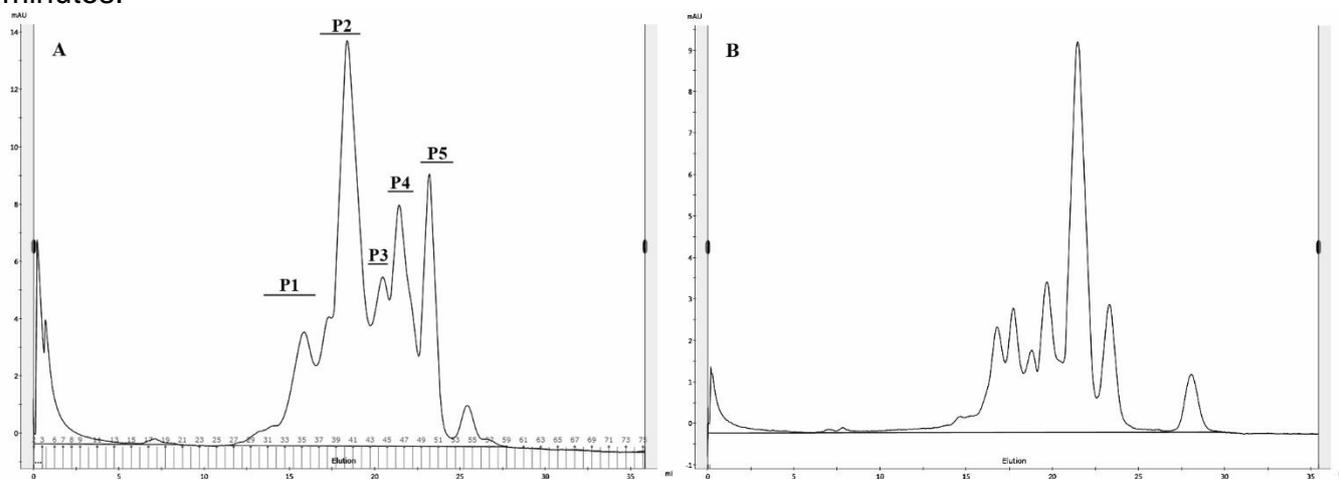
**Figura 5** – (A). Atividade de ORAC-FL dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (B). Atividade de ORAC-FL das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas. As barras de erro representam o desvio padrão.



**Figura 6** – (A). Atividade anti-hipertensiva (%) dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (B). Atividade anti-hipertensiva das frações (< 3 kDa) de peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas. As barras de erro representam o desvio padrão.



**Figura 7** – (A). Cromatograma de exclusão molecular das frações (< 3 kDa) dos peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise da caseína caprina. (B). Cromatografia de exclusão molecular da frações (< 3 kDa) dos peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de horas de hidrólise ao final da digestão intestinal de 120 minutos.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho de tese apresenta resultados promissores e importantes para a contribuição científica na área de liberação de peptídeos biologicamente ativos com a utilização de caseína caprina como substrato. Sucintamente, os principais resultados foram os seguintes: A partir de 70 fungos filamentosos proteolíticos, previamente selecionadas, dois deles, os fungos *Mucor subtilissimus* URM 4133 e *Mucor guilliermondii* URM 5848 proporcionaram os melhores resultados quanto a produção de proteases com ação liberadora de peptídeo bioativos a partir da caseína caprina e foram escolhidos para dar continuidade aos trabalhos. Os planejamentos estatísticos utilizados foram ferramentas de suma importância, tanto para aumentar a produção de proteases, quanto para melhorar a hidrólise da caseína e conseqüentemente, a liberação dos peptídeos. Os estudos de purificação, caracterização bioquímica e termodinâmica das proteases mostraram que, tanto a do fungo *M. subtilissimus* URM 4133, quanto a do fungo *M. guilliermondii* URM 5848, foram completamente inibidas por PMSF, classificando-as como proteases serina, mas com propriedades bioquímicas e cinéticas diferentes. Análises das sequências destas proteases por MALDI-TOF sugerem tratar-se de enzimas novas ainda não catalogadas nos bancos de dados específicos. Os peptídeos selecionados (< 3 kDa), obtidos da hidrólise de caseína por estas proteases, foram bioativos, com grande potencial de atividades antimicrobianas e principalmente atividades antioxidantes e anti-hipertensivas. Com a análise por MALDI-TOF dos peptídeos foi possível identificar novas sequências peptídicas ainda não descritas nos bancos de dados. Também foi demonstrado que os peptídeos selecionados foram capazes de resistir ao processo de digestão gastrointestinal *in vitro*, uma vez que suas atividades biológicas foram preservadas consideravelmente, revelando seu potencial de utilização nas indústrias alimentícias, e/ou farmacêutica, principalmente aquelas voltadas à fabricação de alimentos funcionais. Finalmente, vale salientar que, o apoio financeiro concedido pela FAPESP, na forma da bolsa de doutorado no país processo n°: 2014/13700-3 e da Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE), processo n°: 2016/10289-6, foi imprescindível para a realização e conclusão deste trabalho de tese e, conseqüentemente, para a obtenção de resultados tão significativos para a área científica.