



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE A PARTIR DA
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FARINHA DE PENAS

Igreine Couto da Cunha

Rio Grande - RS

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE A PARTIR DA
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FARINHA DE PENAS

Igreine Couto da Cunha

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Química da
Universidade Federal do Rio
Grande, como requisito para
obtenção do título de mestre
em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Susana Juliano Kalil

Coorientadora: Dra. Luisa Sala

RIO GRANDE – RS

2020

Ficha Catalográfica

C972o Cunha, Igreine Couto da.
Obtenção de peptídeos com atividade antioxidante a partir da hidrólise enzimática da farinha de penas / Igreine Couto da Cunha. – 2020.
77 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Rio Grande/RS, 2020.
Orientadora: Dra. Susana Juliano Kalil.
Coorientadora: Dra. Luisa Sala.

1. Resíduo Avícola 2. Peptídeos 3. Grau de Hidrólise
4. Recuperação de Proteínas 5. Ultrafiltração I. Kalil, Susana Juliano II. Sala, Luisa III. Título.

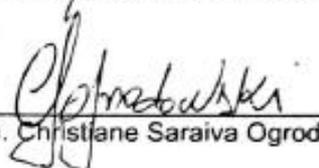
CDU 636.5:67.08

APROVAÇÃO

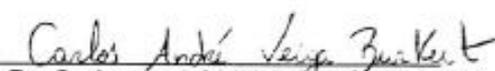
Dissertação defendida por Igreine Couto da Cunha e aprovada em 13 de março de 2020, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



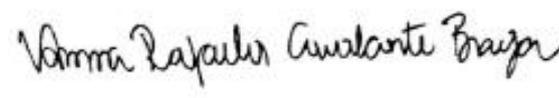
Profa. Dra. Susana Juliano Katil - FURG



Profa. Dra. Christiane Saraiva Ogradowski - FURG



Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert - FURG



Profa. Dra. Anna Rafaela Cavalcante Braga - UNIFESP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Cristina e Edison, por todo amor, apoio, dedicação e por sempre acreditarem em mim. Aos meus irmãos, Owen e Angelina, pelo companheirismo.

Agradeço a Deus todos os dias por ter colocado vocês na minha vida, pois com vocês ela é muito melhor de ser vivida. Amo vocês!

Ao meu namorado, Fabio, pelo teu apoio e incentivo, e por tentar trazer o melhor de mim sempre.

Obrigada por ouvir minhas frustrações e por estar lá, mesmo que a distância. Obrigada pela paciência e parceria. Te amo!

Aos meus professores de mestrado, principalmente a professora Susana, pela orientação e a Luisa Sala pela coorientação, que sempre estiveram dispostas para o que fosse necessário e também pela dedicação e troca de conhecimento. A banca examinadora, pelas correções. Sem vocês nada disso seria possível, muito obrigado.

Agradeço aos colegas de laboratório Thaís, Gabi, Nathiéli, Marina, Júnior e a técnica Ana, pelos ensinamentos com os experimentos e apoio diário. A Jainy e ao Gabriel pela ajuda no período de iniciação científica.

Agradeço também às Professoras Anna Rafaela e Veridiana da UNIFESP por me receberem em seus laboratórios e auxiliarem nas análises de atividade antioxidante. Adorei estar com vocês!

Aos meus colegas desde a Engenharia de Alimentos, que me acompanharam na Engenharia Química e agora no Mestrado, Michele e Cristian. Obrigada por toda a ajuda tanto na graduação, como no mestrado. Nossos almoços semanais vão fazer falta!

As gurias do kitnet 57, Larissa, Victória, Nyala e Gabi (a mais companheira, até pra lavar vidraria), que junto com a Gordinha foram as melhores vizinhas que eu poderia ter encontrado. As junções diárias foram muito importantes pra mim. Muito bom ter dividido momentos com vocês. Ao grupo Gálatas VI, por serem a minha segunda família, por me dar o apoio de seguir em frente e o incentivo que muitas vezes necessitava, principalmente a Alice, Aline, Bruna e Franciene por me ouvirem diariamente, sem vocês essa caminhada se tornaria muito mais complicada.

À CAPES, FAPERGS e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A pena é o material queratinoso mais abundante na natureza, constituindo um subproduto de origem animal com cerca de 80-90% de proteína bruta, sendo que 85-90% dessa proteína é formada por queratina. A resistência das queratinas, somada à sua elevada produção como resíduo, vem despertando interesse na investigação de processos que possam modificar as estruturas proteicas deste material. Dentre as proteases, as queratinases são enzimas específicas, capazes de hidrolisar as ligações peptídicas da queratina, sendo produzidas por diversos micro-organismos, que se destacam, pela capacidade de utilizar materiais de baixo custo como substrato, além de possuir uma alta taxa de produção quando comparados com outras fontes de proteases. O objetivo deste trabalho foi maximizar a hidrólise enzimática da farinha de penas, utilizando a enzima proteolítica de *Bacillus* sp. P45 e avaliar a capacidade antioxidante do hidrolisado enzimático. A hidrólise enzimática foi avaliada através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2⁴, no qual, os efeitos das variáveis concentração de CaCl₂ (0-100 mmol/L), temperatura (35-55 °C), razão enzima/substrato (600-6000 U/g de proteína) e concentração de proteína (10-40 g/L) foi avaliado em 8 h de reação, tendo como respostas o grau de hidrólise (GH) e a recuperação de proteína (RP). Os maiores valores de GH e RP foram obtidos quando a hidrólise foi realizada com 50 mmol/L de CaCl₂, 50 °C, 6000 U/g de proteína e concentração proteica de substrato de 10 g/L, na qual o hidrolisado apresentou um GH de 8,7% e uma RP de 38,4%. Os peptídeos obtidos foram separados por massa molar através de ultrafiltração nas membranas de corte de 3 e 10 kDa e as atividades antioxidantes das diferentes frações foram avaliadas. A fração <3 kDa apresentou maior capacidade de sequestro dos radicais ABTS^{•+} e peroxila, 90,20 e 1892,47 µmol de Trolox/g, respectivamente. O presente estudo mostra o potencial da protease de *Bacillus* sp. P45 em hidrolisar a farinha de penas, visto que com o planejamento proposto foi possível a maximização e aumento de 2,48 vezes do GH e 2,37 vezes da RP, em comparação aos ensaios iniciais realizados, resultando em peptídeos com atividade antioxidante.

Palavras-chave: resíduo avícola; peptídeos; grau de hidrólise; recuperação de proteínas; ultrafiltração

ABSTRACT

Feather is the most abundant keratinous material in nature. This by-product of animal origin presents around 80-90% of crude protein, of which 85-90% is keratin. The resistance of keratins and its high production as waste have been awakening interest in the investigation of processes that can modify the protein structure of this material. Keratinases are specific enzymes capable of hydrolyzing the peptide bonds of keratin. These are produced by several microorganisms, which stand out in the production of proteases due to the ability to use low-cost materials as a substrate, in addition to showing a high production rate when compared to other protease sources. The aim of this work was to maximize the enzymatic hydrolysis of feather meal through the use of the proteolytic enzyme from *Bacillus* sp. P45 and to evaluate the antioxidant capacity of the hydrolysate. Enzymatic hydrolysis was evaluated using a 2^4 central composite rotatable design (CCRD), where the effects of the variables CaCl_2 concentration (0-100 mmol/L), temperature (35-55 °C), enzyme/substrate ratio (600-6000 U/g protein) and protein concentration in substrate (10-40 g/L) were evaluated in 8 h of reaction. The response variables were the degree of hydrolysis (DH) and protein recovery (PR). The highest values of DH and PR were obtained when hydrolysis was performed with 50 mmol/L of CaCl_2 , 50 °C, 6000 U/g-protein and protein concentration of 10 g/L, where the hydrolysate presented DH of 8.7% and PR of 38.4%. The peptides obtained were separated by molar weight through ultrafiltration using membranes of 3 and 10 kDa and the antioxidant activities of the different fractions were investigated. The fraction <3 kDa showed the highest scavenging capacity against the $\text{ABTS}^{\bullet+}$ and peroxy radicals, 90.20 and 1892.47 $\mu\text{mol Trolox/g}$, respectively. The present study shows the potential of *Bacillus* sp. P45 to hydrolyze feather meal, once it was possible to maximize and increase the DH by 2.48-fold and the PR by 2.37-fold, compared to the initial tests performed, resulting in peptides with antioxidant activity.

Keywords: poultry waste; peptides; degree of hydrolysis; protein recovery; ultrafiltration

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Composição da pena.	17
Tabela 2 - Condições de hidrólise enzimática para diferentes substratos proteicos.	25
Tabela 3 - Valores codificados e reais das variáveis independentes utilizadas no planejamento experimental.....	34
Tabela 4 - Recuperação de proteínas em 6 e 8 h de reação com e sem ajuste de pH.....	39
Tabela 5 - Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 ⁴ , valores codificados e reais (entre parênteses), grau de hidrólise e recuperação de proteínas em 8 h de hidrólise.	42
Tabela 6 - Coeficiente de regressão, erro padrão e nível de significância (p) para o grau de hidrólise.	43
Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) do DCCR 2 ⁴ para o grau de hidrólise.	43
Tabela 8 - Coeficiente de regressão, erro padrão e nível de significância (p) para a recuperação de proteínas.	48
Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) do DCCR 2 ⁴ para a recuperação de proteínas.	48
Tabela 10 - Valores codificados e reais (entre parênteses) das variáveis independentes para os ensaios de validação da hidrólise da farinha de penas.	51
Tabela 11 - Valores experimentais, preditos e desvio relativo para grau de hidrólise e recuperação de proteínas nos ensaios de validação em 8 h de reação.	54
Tabela 12 - Atividade antioxidante utilizando o método ABTS ^{•+} (µmol TE/g) e ORAC (µmol TE/g) das amostras não hidrolisada, não ultrafiltrada e das suas frações.	56

LISTA DE FIGURA

Figura 1 - Grau de hidrólise para a incubadora rotatória e reator em 8 h de reação.....	40
Figura 2 - Curva de contorno para grau de hidrólise em função da concentração de proteína do substrato e da concentração de cálcio no extrato enzimático.	44
Figura 3 - Curva de contorno para o grau de hidrólise em função da concentração de proteína do substrato e da razão E/S.....	45
Figura 4 - Curva de contorno para o grau de hidrólise em função da razão E/S e da concentração de cálcio no extrato enzimático.	46
Figura 5 - Curva de contorno para o grau de hidrólise em função da razão E/S e da temperatura.	47
Figura 6 - Curva de contorno para a recuperação de proteínas em função da razão E/S e da temperatura.	49
Figura 7 - Grau de hidrólise para os ensaios de validação ao longo de 12 h de reação..	51
Figura 8 - Recuperação de proteínas para os ensaios de validação ao longo de 12 h de reação.....	53
Figura 9 - Fluxo de permeado nos ensaios de ultrafiltração.....	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	INDÚSTRIA AVIÁRIA	15
3.2	RESÍDUO DA INDÚSTRIA AVIÁRIA	16
3.3	QUERATINA	18
3.4	ENZIMAS MICROBIANAS	19
3.4.1	Proteases	20
3.5	HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS	23
3.6	FRACIONAMENTO DOS HIDROLISADOS	27
3.7	PROPRIEDADE DOS HIDROLISADOS PROTEICOS	29
3.7.1	Propriedades antioxidantes dos peptídeos	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	SUBSTRATO PROTEICO	32
4.2	OBTENÇÃO DA ENZIMA	32
4.3	ENSAIOS DE HIDRÓLISE DA FARINHA DE PENAS	33
4.3.1	Preparo da solução enzimática e do substrato	33
4.3.2	Escolha do sistema reacional	33
4.3.3	Maximização dos ensaios de hidrólise	34
4.3.4	Validação do modelo	34
4.4	GRAU DE HIDRÓLISE	35
4.5	RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNAS	36
4.6	FRACIONAMENTO DOS HIDROLISADOS	36
4.7	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	36
4.7.1	Método da capacidade sequestradora do radical ABTS⁺	36
4.7.2	Determinação da capacidade antioxidante pelo ensaio ORAC	37
4.8	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	37
4.8.1	Determinação da atividade enzimática	37
4.8.2	Determinação do teor de proteínas	38
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	PRODUÇÃO DE PROTEASE DE <i>Bacillus</i> SP. P45	39
5.2	ESCOLHA DO SISTEMA REACIONAL	39
5.3	MAXIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FARINHA DE PENAS	41
5.3.1	Grau de hidrólise	41
5.3.2	Recuperação de proteínas	47
5.3.3	Validação do DCCR 2⁴	50
5.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS HIDROLISADOS	54
6	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

As penas representam 7-10% do peso corporal total das aves e constituem o material queratinoso mais abundante na natureza (TESFAYE; SITHOLE; RAMJUGERNATH, 2017). Grande quantidade deste material tem sido gerado como resíduo inevitável durante o processamento de aves (CALLEGARO; WELTER; DAROIT, 2018). As penas obtidas do processamento de abate de aves apresentam cerca de 80-90% de proteína, sendo que 85-90% dessa proteína bruta é formada por queratina (TESFAYE et al., 2017a).

O acúmulo desse resíduo gera uma degradação anaeróbica da queratina, que resulta na produção de substâncias tóxicas, como sulfeto de hidrogênio e amônia. As agroindústrias de aves geram grandes quantidades de subprodutos, sendo que esses resíduos orgânicos são convertidos em ração animal, fertilizantes ou são completamente descartados. O descarte inadequado desses resíduos causa poluição ambiental, doenças e perda de recursos biológicos úteis, como as proteínas (TESFAYE et al., 2017a).

As proteínas ao invés de se tornarem um resíduo, podem ser hidrolisadas por via química (MUSTĂȚEA; UNGUREANU; IORGA, 2019) ou enzimática (MONTILHA et al., 2017). A hidrólise enzimática é capaz de alterar as propriedades químicas, funcionais e sensoriais de subprodutos ricos em proteínas e é uma alternativa atraente em relação às reações químicas ou transformações físicas, devido a sua especificidade e condições moderadas de reação que diminuem a chance de desnaturação de peptídeos desejáveis (LAPENÑA et al., 2018).

As ligações peptídicas presentes nas proteínas podem ser hidrolisadas por proteases, também denominadas enzimas proteolíticas (CONTESINI; MELO; SATO, 2017). Devido a sua diversidade, facilidade de manipulação fisiológica e ao seu pequeno tempo de geração, a produção de proteases microbianas vem apresentando vantagem em relação a proteases de plantas e animais (LAPENÑA et al., 2018).

Dentre os potenciais micro-organismos, a bactéria *Bacillus* sp. P45 foi reportada por Daroit, Corrêa e Brandelli (2009) pela eficiente degradação de penas de frango, devido à produção de enzimas proteolíticas. O gênero *Bacillus* é considerado um dos maiores produtores de enzimas industriais. O mercado global de enzimas industriais foi estimado em US\$ 5,5 bilhões em 2018 e deve crescer no período de 2018 a 2023, podendo atingir aproximadamente US\$ 7,0 bilhões (BBC RESEARCH, 2018).

A hidrólise proteica é uma tecnologia desenvolvida como forma de agregar valor e funcionalidade. Os peptídeos presentes nos hidrolisados proteicos, quando tratados de forma enzimática, têm mostrado diferentes propriedades físico-químicas e atividades biológicas que

dependem de sua sequência de aminoácidos (SARMADI; ISMAIL, 2010). A hidrólise enzimática pode ser afetada por diversos fatores como a escolha da enzima, o tipo e a concentração de substrato, concentração da enzima, o pH, o tempo de reação e a temperatura de processo. Esta última pode afetar a hidrólise através da desnaturação térmica (SEO et al., 2015; WANG et al., 2015). Para evitar a desnaturação térmica, a utilização de íons metálicos como CaCl_2 , é feita, sendo capaz de aumentar a atividade da enzima (ZHANG et al., 2019).

A hidrólise enzimática de proteínas pode originar peptídeos capazes de modular funções fisiológicas, denominados peptídeos bioativos, como acontece na hidrólise da caseína bovina (VAIRO CAVALLI et al., 2008) e do isolado proteico de soja (OLIVEIRA et al., 2015), entre outros. A utilização de farinha de penas como substrato proteico em processos de hidrólise enzimática é uma alternativa para reduzir a poluição, gerando uma forma biologicamente eficiente para a reciclagem de nutrientes, visto que as penas podem ser hidrolisadas por enzimas proteolíticas denominadas queratinases, produzidas na presença de substratos contendo queratina (GUPTA et al., 2013).

Frente a este cenário, o estudo dos parâmetros de hidrólise é necessário, para que seja possível provocar a liberação de peptídeos com diferentes funcionalidades, resultando em hidrolisados de proteínas que podem ser aplicados em vários produtos, devido às suas propriedades nutricionais e funcionais (RUTHERFURD, 2010; SEO et al., 2015). Peptídeos bioativos podem exercer determinadas atividades biológicas como capacidade antioxidante, que dependem de diversos fatores, tais como: tipo de proteína, enzima empregada, grau de hidrólise e massa molar dos peptídeos gerados (BAH et al., 2015). O fracionamento dos hidrolisados para a aquisição de peptídeos de menor massa molar tem se mostrado eficaz na obtenção de hidrolisados com atividades biológicas (CENTENARO et al., 2014; ZHANG et al., 2019).

O Laboratório de Microbiologia e Biosseparações da Universidade Federal do Rio Grande vem realizando pesquisas com a enzima produzida por *Bacillus* sp. P45 desde 2010. A protease purificada de *Bacillus* sp. P45 foi utilizada na hidrólise de caseína e plasma de sangue bovino e peptídeos com atividade antioxidante foram obtidos (GONÇALVES, 2016). Borba (2019) maximizou o grau de hidrólise do plasma de sangue bovino visando à obtenção de peptídeos bioativos a partir de protease P45. A farinha de penas não foi utilizada como substrato para hidrólise, sendo utilizada apenas para a produção de protease por cultivo submerso de *Bacillus* sp. P45 (LEMES, 2015).

Considerando o exposto acima, este trabalho visou explorar as condições operacionais da hidrólise enzimática da farinha de penas utilizando a protease de *Bacillus* sp. P45 e avaliar as propriedades antioxidantes do hidrolisado fracionado por ultrafiltração.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Maximizar a hidrólise da farinha de penas catalisada pela enzima proteolítica de *Bacillus* sp. P45 e avaliar a capacidade antioxidante do hidrolisado fracionado por ultrafiltração.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito das condições de processo (temperatura, razão enzima/substrato, concentração proteica de substrato e uso de cálcio no extrato enzimático) sobre o grau de hidrólise (GH) e recuperação de proteína (RP), através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2⁴;

- Maximizar a hidrólise enzimática da farinha de penas através da metodologia de superfície de resposta, de modo a obter maiores valores de grau de hidrólise e de recuperação de proteína;

- Avaliar a atividade antioxidante dos hidrolisados fracionados por técnica de ultrafiltração nas membranas de corte de 3 e 10 kDa.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 INDÚSTRIA AVIÁRIA

A carne de frango é o segundo tipo de carne mais consumida no mundo, ficando atrás apenas da carne suína (PINTO et al., 2015). Segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2018), em 2017 a produção brasileira de carne de frango foi de 13,5 milhões de toneladas, mantendo o País na posição de maior exportador mundial e de segundo maior produtor de carne de frango, atrás apenas dos Estados Unidos. Do total de frangos produzidos pelo País em 2017, 66,9% foram destinados ao consumo interno e 33,1% para exportação. A região sul do Brasil é responsável por mais de 60% do abate de frangos no país (IBGE, 2018).

O setor avícola industrial emprega mais de 5 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. Este setor é representado por milhares de produtores integrados, centenas de empresas beneficiadoras e dezenas de empresas exportadoras, o que ressalta sua importância para o País (ABPA, 2018).

O consumo de carne de frango vem aumentando nos últimos anos devido a sua maior incorporação na dieta e também pela substituição de outras carnes, o que proporciona um aumento da produção avícola. A produção da carne de frango no Brasil é a que mais deverá crescer nos próximos anos, passando de 13 mil toneladas em 2017, para 17 mil toneladas em 2027 (ABPA, 2018). O consumo de carne de frango deverá ultrapassar o consumo de carne suína (FAO, 2015). Uma das razões é a carne de frango ser a carne mais acessível por razões econômicas, e além disso restrições religiosas que proíbem o consumo de carne bovina e suína em todo o mundo não se aplicam ao frango.

O processamento de aves engloba desde a criação das aves vivas até a embalagem e armazenamento da carne. O processo leva à produção de subprodutos não comestíveis e comestíveis (TESFAYE; SITHOLE; RAMJUGERNATH, 2017). Penas são os principais componentes dos subprodutos não comestíveis. O abate tem como finalidade a remoção de componentes indesejáveis tais como sangue, pés, penas e vísceras e o retardo do desenvolvimento de micro-organismos e diminuição da contaminação, especialmente patogênicos, tornando o alimento apto para consumo (PINTO et al., 2015).

O abate é constituído de diversas etapas. Primeiramente as aves são recepcionadas de forma mais rápida possível para que o estresse pré-abate seja reduzido. Os frangos são pendurados pelas pernas e o procedimento de atordoamento é realizado, deixando as aves em

estado de insensibilidade, quando podem ser encaminhadas para o corte e sangria. Na fase de depenagem, asas, pernas, pescoço e corpo são depenados sem que a carcaça seja danificada. As penas, juntamente com sangue diluído, graxa e água de limpeza, são bombeados para um recipiente seguido de triagem, onde as penas são transportadas para uma área de armazenamento temporário antes do descarte. Por último, é realizada a etapa de evisceração onde a inspeção federal verifica a sanidade das aves (SARAVANAN; DHURAI, 2012).

O maior desafio do setor agropecuário é a eliminação ou reutilização dos resíduos de forma adequada e de baixo custo, prevenindo a criação de insetos e a formação de odores desagradáveis, pois a criação e o processamento industrial de aves podem acarretar problemas de contaminação ambiental pela disposição inadequada de resíduos, podendo trazer problemas graves, como o comprometimento do ecossistema (NETO et al., 2018). Todas as etapas do processamento industrial contribuem para a carga de resíduos possivelmente impactantes ao meio ambiente.

Os subprodutos de abatedouros avícolas são compostos por sangue, penas, pés, cabeças e ossos. O processamento adequado das farinhas de origem de subprodutos avícolas reduz a carga poluente e os micro-organismos patogênicos (NETO, 1994). Em consequência do aumento do abate de aves nas indústrias, há um acréscimo na disponibilidade de penas, que são constituídas basicamente de queratina.

3.2 RESÍDUO DA INDÚSTIA AVIÁRIA

Os resíduos de origem aviária apresentam proteínas de alto valor biológico (LASEKAN; ABU; HASHIM, 2013). O sangue representa de 2 a 6% e as penas cerca de 10% do peso total da ave (NASCIMENTO; GOMES; ALBINO, 2004). O Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA, 2012), em uma seleção de dados da literatura, indica que uma unidade industrial com capacidade de abate médio de 165 mil aves/dia gera aproximadamente 18,5 toneladas de penas como resíduo sólido.

As penas obtidas do processamento de abate de aves apresentam cerca de 80-90% de proteína (ZERDANI; MOHAMED; MALKI, 2004). Apesar do elevado teor de proteína bruta, sabe-se que 85 a 90% dessa proteína é formada por queratina, na conformação β -queratina. A composição completa das penas é apresentada na Tabela 1. Os principais aminoácidos encontrados nas penas são cisteína, glutamina, prolina e serina (SARAVANAN; DHURAI, 2012).

Tabela 1 - Composição da pena.

Composição	%
Lipídios	0,83
Fibras	2,15
Proteína bruta	82,36
Cinza	1,49
Carboidratos	1,02
Umidade	12,33

Fonte: Adaptado de TESFAYE et al. (2017a)

Mais comumente, as penas são convertidas em farinha de penas. Inicialmente, são lavadas com água após a coleta, seguidas por um processo de cocção sob pressão e moagem (ONIFADE et al., 1998). As penas são resíduos sólidos abundantes que necessitam de destino adequado. Embora possam ser incineradas e mesmo destinadas a aterros sanitários, essas estratégias podem resultar em contaminação ambiental e liberação de gases tóxicos (amônia e sulfeto de hidrogênio). No caso de aterros, a queratina retarda a degradação das penas, necessitando assim de uma demanda grande de área para sua deposição (LASEKAN; ABU; HASHIM, 2013), que deve ser rigorosamente regulamentada, pela possibilidade de contaminação de lençóis freáticos, solo e ar, aumentando as despesas do aterro (VEERABADRAN et al., 2012).

Legislações em todo o mundo incentivam a valorização dos resíduos e subprodutos de processos de fabricação (BAIANO, 2014). O desafio é projetar tecnologias que convertam resíduos em produtos valiosos. Ainda há muita pesquisa para ser explorada na utilização de penas, levando em consideração seus constituintes químicos, seu baixo preço e alta disponibilidade.

A resistência das queratinas, somada à sua elevada produção como resíduo, vem despertando intenso interesse na investigação da capacidade de micro-organismos em degradar materiais ricos em queratina. A maioria das bactérias queratinolíticas descritas na literatura quanto à sua potencial aplicação relacionam-se ao gênero *Bacillus* (GUPTA; RAMNANI, 2006).

Micro-organismos podem ser utilizados no bioprocessamento das penas, resultando na agregação de valor a estes resíduos. Tais tecnologias representam estratégias eficientes, de baixo custo e ecologicamente seguras (BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010). Dentre os produtos de elevado valor agregado obtidos a partir do bioprocessamento das penas estão as

enzimas proteolíticas, que possuem ampla aplicação em diversos setores industriais (KASANA; SALWAN; YADAV, 2011).

Devido ao seu elevado teor de nitrogênio, cerca de 13% (TESFAYE; SITHOLE; RAMJUGERNATH, 2017), as penas podem ser convertidas em hidrolisados proteicos para o preparo de fertilizantes nitrogenados, gerando produtos com fácil produção e economicamente viáveis. Sobucki et al. (2019) observaram que hidrolisados de penas obtidos através da conversão microbiana, aumentaram o crescimento de biomassa de alface cultivada em estufa quando comparada com um fertilizante referência de ureia, em um período de 60 d. O mesmo não ocorreu ao se utilizar farinha de penas na germinação de sementes de tomate. Em concentrações menores de 3 g de farinha de pena por kg de semente, a germinação foi pouco afetada e diminuiu em concentrações maiores (DIAZ-PEREZ; KEITH JENKINS, 2017)

Utilizando penas como substrato, Kalaikumari et al. (2019) produziram uma queratinase a partir de uma bactéria queratinolítica (*Bacillus paralicheniformis* MKU3) para estudar a depilação em pele de ovelha. A análise das propriedades físicas da crosta do couro não mostrou efeitos negativos sobre a qualidade do couro produzido, gerando resultados satisfatórios. Tesfaye et al. (2017a) realizaram testes de queima e durabilidade na pena e confirmaram que a mesma se comporta de forma semelhante à fibra animal, abrindo espaço para estudos que convertam a pena em produtos relevantes de alto valor, podendo ser utilizada como uma matéria-prima valiosa em têxteis (BROWNSTONE, 2015), indústria de papel (TESFAYE et al., 2017b) e até mesmo em embalagens térmicas (DIECKMANN et al., 2019).

Uma grande quantidade de proteínas e aminoácidos presentes nas penas poderia ser utilizada benéficamente na alimentação de animais como alternativa para reciclagem deste produto. Estudos foram realizados agregando a farinha de penas em rações para peixes (CAMPOS et al., 2017; WU et al., 2017) e suínos (PAN et al., 2016). No entanto, ainda existem limitações para essa utilização, que são a baixa digestibilidade (consequência da composição e da conformação molecular da queratina), o baixo valor biológico e a deficiência de alguns aminoácidos essenciais (DIVAKALA et al., 2009; ONIFADE et al., 1998).

3.3 QUERATINA

Queratinas são proteínas pertencentes ao grupo escleroproteína. Majoritariamente presente nas penas, também estão presentes em cascos, escamas, pelos, pele humana e unhas, são impermeáveis a produtos químicos e físicos (TESFAYE; SITHOLE; RAMJUGERNATH, 2017), apresentam baixa solubilidade, alta estabilidade e resistência a ação de enzimas

proteolíticas comuns, tais como tripsina ou pepsina (GRAEFF; MONDARDO, 2006). Esta resistência ocorre não só pelo fato da composição e configuração molecular dos aminoácidos constituintes responsáveis pela sua rigidez, como também pelo fato da cadeia da queratina ser firmemente enovelada em α -hélice (α -queratina) ou β -folha (β -queratina) (RIFFEL et al., 2003).

As queratinas são diversificadas em estrutura molecular. As α - e β -queratinas têm sido amplamente estudadas e historicamente consideradas convergentes em termos de estrutura e função. No entanto há pouca similaridade em sequência e muitas diferenças moleculares entre elas. As α -queratinas são encontradas em todos os vertebrados enquanto as β -queratinas são encontradas exclusivamente em répteis e aves (BRUSH, 1996).

A baixa digestibilidade e insolubilidade da queratina é consequência da estrutura da proteína. Branco et al. (2003) citam que a baixa digestibilidade e insolubilidade das penas também são atribuídas às pontes de hidrogênio. Interações hidrofóbicas dentro da molécula de queratina e pontes de enxofre presentes na cistina contribuem para manter a maior estabilidade da proteína, quando atacada por enzimas digestivas.

O alto conteúdo de cisteína possibilita a formação de um grande número de pontes dissulfeto, uma forte ligação covalente que estabiliza a estrutura proteica tridimensional e é muito difícil de quebrar. Quando são ricas em cisteínas, as queratinas são classificadas como “rígidas”, pois contém muitas ligações dissulfeto. Exemplos dessa classe são as penas e pelos, que contém cerca de 5 a 14% de cisteína. As queratinas classificadas como “leves” apresentam aminoácidos com cadeias laterais pequenas como glicina e serina e baixo teor de cisteína, sendo as queratinas presentes na pele um exemplo (DAROIT; BRANDELLI, 2013). As queratinas podem ser degradadas por enzimas proteolíticas denominadas queratinases, que são produzidas somente na presença de substratos contendo queratina, hidrolisando as ligações peptídicas da queratina (BOCKE; GALUNSKY; MULLER, 1995).

3.4 ENZIMAS MICROBIANAS

As enzimas, por atuarem como catalisadores de sistemas biológicos, são fundamentais para qualquer processo bioquímico, pois possuem a capacidade de aumentar a velocidade de uma reação pela redução da energia de ativação, sem alterar o equilíbrio reacional. Por atuar em condições mais brandas de pH, temperatura e por serem altamente específicas, são mais vantajosas que catalisadores inorgânicos ou sintéticos (NELSON; COX, 2011).

Enzimas podem sofrer uma variedade de reações de desnaturação durante a produção, armazenamento e aplicação na indústria. A desnaturação pode acontecer de forma reversível, onde há o desdobramento da estrutura terciária da enzima em desordenadas cadeias polipeptídicas, ou de forma irreversível, onde ela perderá sua atividade catalítica (IYER; ANANTHANARAYAN, 2008).

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), com a descoberta de uma variedade de enzimas, adotou um sistema de nomenclatura identificando as enzimas em seis classes, de acordo com a natureza da reação química que catalisam. São elas: oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Para cada enzima são atribuídos dois nomes e um número de classificação de quatro dígitos que identificam as classes, as subclasses e as sub-subclasses. A cada enzima é atribuído um “EC” (Enzyme commission) que contém 4 números separados por pontos (MOTTA, 2011).

As hidrolases são enzimas que quando associadas a moléculas de água promovem a quebra de ligações covalentes, representando um importante grupo de enzimas amplamente aplicadas em diferentes campos industriais. Entre essas enzimas, destacam-se as proteases (KUDDUS; RAMTEKE, 2012). Estudos avançados mostram que as proteases conduzem modificações específicas e seletivas em proteínas (RAO et al., 1998).

3.4.1 Proteases

As proteases, também denominadas como enzimas proteolíticas ou peptidases, são enzimas capazes de hidrolisar as ligações peptídicas presentes nas proteínas, isto é, possuem atividade proteolítica (ROMERO et al., 2001). Uma grande variedade de funções fisiológicas complexas são executadas por proteases e as mesmas são classificadas em extracelulares e intracelulares. As proteases extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em moléculas menores para consequente absorção pelas células, enquanto as intracelulares possuem um papel vital na regulação do metabolismo (GUPTA et al., 2002; RAO et al., 1998).

Dependendo do seu local de ação, as proteases são subdivididas em dois grupos principais, exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases atuam apenas perto das extremidades das cadeias polipeptídicas, sendo classificadas como aminopeptidases e carboxipeptidases. As endopeptidases são caracterizadas pela sua ação preferencial nas ligações peptídicas nas regiões internas da cadeia polipeptídica e são divididas em quatro subgrupos baseados em seu mecanismo catalítico, serino proteases (EC 2.4.21), cisteíno proteases (EC 2.4.22), proteases aspárticas (EC 2.4.23), metaloproteases (EC 2.4.24) (SOUZA et al., 2015).

As proteases podem ser produzidas por plantas (VAN DER HOORN et al., 2004), micro-organismos (CHENG; WANG; WANG, 2012) e animais (AHMED et al., 2013). Micro-organismos são fontes de proteases que necessitam de um pequeno espaço para cultivo e rápido crescimento, além de possuírem uma ampla biodiversidade, quando comparado com plantas e animais. Enzimas extracelulares produzidas por micro-organismos são preferidas, pois são facilmente recuperadas após os cultivos microbianos. A produção destas enzimas é fortemente influenciada pela concentração do inóculo, nutrientes e fatores físico-químicos, tais como temperatura, pH e fontes de nitrogênio e carbono (RAO et al., 1998; VERMELHO et al., 2008).

A literatura relata vários micro-organismos capazes de produzir proteases extracelulares, como *Aspergillus oryzae* (BELMESSIKH et al., 2013), *Aureobasidium pullulans* (CHI et al., 2007), *Serratia marcescens* (BACH et al., 2012) e *Bacillus subtilis* (HELAL et al., 2012). Os micro-organismos responsáveis pela produção de proteases em nível industrial são os fungos e as bactérias. Diferentes substratos, naturais ou sintéticos, podem ser utilizados para a detecção das proteases, sendo os mais comuns caseína e azocaseína (KASANA; SALWAN; YADAV, 2011).

As proteases são utilizadas em inúmeros setores, com diversas finalidades na indústria farmacêutica como ferramenta para a preparação de medicamentos quirais, sínteses de produtos de valor agregado (GOTOR-FERNÁNDEZ; BRIEVA; GOTOR, 2006) e permeabilidade de medicamento nas unhas (MOHORCIC et al., 2007), na indústria alimentícia (HIDALGO et al., 2012), na produção de peptídeos bioativos e amadurecimento de queijo (CONTESINI; MELO; SATO, 2017) e na indústria têxtil, evitando o encolhimento e eliminando as fibras de lã, por exemplo (KUMAR; TAKAGI, 1999). O primeiro detergente contendo uma enzima foi desenvolvido no início do século XX, sendo que tratava-se da protease tripsina produzida no pâncreas de mamíferos, porém, não obteve sucesso pois a tripsina não era ativa em líquidos com pH acima de 9 (GUPTA et al., 2002; VERMELHO et al., 2008). Além de suas aplicações industriais, as proteases desempenham um papel importante na pesquisa básica, pois a clivagem de ligações peptídicas leva à degradação de substratos proteicos em seus aminoácidos constituintes, ou pode ser específica, levando à clivagem seletiva da proteína (RAO et al., 1998).

As proteases produzidas por micro-organismos queratinolíticos são chamadas de queratinases. Embora essa proteína possa ser produzida a partir de fungos do gênero *Doratomyces* (GRADISAR; KERN; FRIEDRICH, 2000), a procura por queratinases bacterianas tem sido intensa. Dentre as bactérias, a atividade queratinolítica tem sido bastante

estudada entre cepas do gênero *Bacillus* (WERLANG; BRANDELLI, 2005) e *Streptomyces* (MABROUK, 2008).

A produção de queratinase é induzida por substratos queratinosos (penas, farinha de pena e pelos) adicionados ao meio de cultivo como fonte de carbono e energia para o crescimento do micro-organismo. A queratinase constitui um tipo específico de protease por possuir a capacidade de degradar substratos insolúveis ricos em queratina que apresentam alta estabilidade e difícil degradação (BRANDELLI, 2008). Sabe-se que na produção de enzimas industriais até 30 - 40% do custo de produção são devido ao substrato de crescimento do micro-organismo produtor. Por isso, o uso das penas, um substrato altamente disponível e de baixo custo, poderia resultar em uma redução significativa no custo da produção enzimática (GESSESSE et al., 2003).

Atualmente, a maioria das proteases utilizadas são produzidas por várias espécies de bactérias, destacando-se as do gênero *Bacillus*, que por serem predominantemente extracelulares e por sua variabilidade possuem grande potencial tecnológico e relevância comercial (GULMEZ et al., 2018; VERMELHO et al., 2008). Esse gênero possui um atrativo industrial por ter a capacidade de degradar e utilizar proteínas como nutrientes (RIFFEL; BRANDELLI, 2006). Proteases neutras bacterianas pertencentes ao gênero *Bacillus* são ativas em uma faixa de pH entre 5 e 8 e possuem tolerância térmica relativamente baixa (RAO et al., 1998).

O gênero *Bacillus* é um dos maiores em microbiologia e atualmente é considerado um dos maiores produtores de enzimas industriais devido às suas características como sua alta taxa de crescimento e a capacidade de secretar grande quantidade de proteínas para o meio extracelular (GORDON et al., 1973). O micro-organismo *Bacillus* sp. P45 (número de acesso no GenBank AY962474) foi isolado a partir do intestino do peixe Jaraqui (*Piaractus mesopotamicus*) da bacia amazônica. A cepa deste micro-organismo se enquadra no grupo de micro-organismo *Bacillus subtilis* (SIRTORI et al., 2006), sendo um micro-organismo reconhecido sob certificação GRAS, ou seja, ao ser adicionado a algum alimento é considerado seguro por especialistas (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009).

A bactéria *Bacillus* sp. P45 foi reportada por Daroit Corrêa e Brandelli (2009) pela eficiente degradação de penas de frango, viabilizando assim a produção de enzimas a partir deste micro-organismo, devido ao fato do meio ser de baixo custo, fornecendo um meio de cultivo com fonte de carbono e nitrogênio. A partir da bactéria *Bacillus* sp. P45 foi possível observar a produção de uma serino protease queratinolítica, mesofílica e extracelular (DAROIT et al., 2010). A protease P45 bruta é ativa em valores de pH quase neutros, onde apresentou

máxima atividade a 50 °C e pH 7,0, sendo fortemente inibida pelo EDTA, indicando a importância dos íons metálicos para atividade e estabilidade desta enzima (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011). A produção de proteases por *Bacillus* é fortemente influenciada por fatores físicos tais como o pH, temperatura e tempo de incubação, além de fatores como componentes do meio e a presença de íons metálicos (DAROIT; BRANDELLI, 2013).

3.5 HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS

A hidrólise enzimática de proteínas é uma alternativa atraente em relação às reações químicas ou transformações físicas, devido à sua especificidade e condições moderadas de reação. Processos químicos, como a hidrólise alcalina ou ácida, tendem a desnaturar aminoácidos, diminuindo o valor nutricional da fonte de proteína. A hidrólise enzimática é desenvolvida sob condições suaves de pH (entre 6 e 8) e temperatura (entre 40 e 60 °C), evitando os extremos usualmente necessários para os tratamentos físicos e químicos, e minimizando reações paralelas (CLEMENTE, 2000; SARMADI; ISMAIL, 2010). Além do mais, a utilização de enzimas pode ser feita em concentrações muito baixas e sua remoção do sistema da reação é desnecessária (REED, 1975).

A hidrólise de proteínas atua na modificação das propriedades funcionais das proteínas, incluindo mudanças na solubilidade, geleificação e características emulsificantes, redução da alergia proteica, transformação do sabor ou liberação de peptídeos bioativos, além de diminuir a massa molar e aumentar o número de grupos ionizáveis, através da exposição de grupos hidrofóbicos (TAVANO, 2013).

A hidrólise enzimática tem capacidade de melhorar ainda mais as propriedades das proteínas, como já foi relatado com hidrolisados de caseína (CAVALLI et al., 2008) e em hidrolisados de caseinato ovino, utilizando queratinase de *Bacillus* sp. P7, onde foi observado a formação de compostos com potencial anti-hipertensivo, além de outros com potencial antioxidante e antimicrobiano (CORRÊA et al., 2011).

Proteases são enzimas extremamente versáteis. Existe uma grande variedade de proteases microbianas que possuem diversas especificidades e aplicações. Conhecer as características dessas proteases é um fator muito importante para o seu uso na hidrólise enzimática de proteínas. Os processos biotecnológicos que requerem peptídeos específicos são altamente dependentes do uso de proteases microbianas que representam uma ferramenta importante na modificação de estruturas proteicas (SANTOS AGUILAR; SATO, 2018). Estes

hidrolisados têm sido usados para melhorar a digestão e absorção de fontes de proteínas e como uma fonte de peptídeos bioativos (RUTHERFURD-MARKWICK; MOUGHAN, 2005).

No desenvolvimento da indústria, a utilização de hidrolisados proteicos tem aumentado, devido às suas desejáveis propriedades nutricionais e funcionais (RUTHERFURD, 2010). Peptídeos bioativos são considerados fragmentos específicos de proteínas que estão inativos dentro da sequência da proteína e podem ser liberados por hidrólise enzimática, exercendo diversas funções (SARMADI; ISMAIL, 2010). A digestibilidade de proteínas está relacionada com a solubilidade e com o grau de hidrólise (OWUSU-APENTEN, 2004).

O grau de hidrólise (GH), definido como a quantidade de ligações peptídicas clivadas num hidrolisado de proteína, é utilizado como parâmetro de monitoramento de hidrólise. Quanto maior o GH, maior o número de peptídeos produzidos na solução. O aumento da produção de peptídeos durante a reação de hidrólise resulta no aumento da solubilidade da proteína (RUTHERFURD, 2010).

A hidrólise enzimática pode ser afetada por diversos fatores, alguns deles são: a escolha da enzima, o tipo de substrato, concentração de substrato, concentração da enzima, o pH, o tempo de reação e a temperatura de processo. Por esse motivo, se torna necessário um estudo dos parâmetros de hidrólise, para entendimento do processo. Na literatura são encontrados muitos estudos que abordam a hidrólise de diferentes substratos proteicos por proteases, onde diferentes parâmetros de hidrólise são investigados. Na Tabela 2 é possível observar as condições de hidrólises estudadas, de alguns substratos proteicos submetidos à hidrólise enzimática, tendo como resposta o GH e a recuperação de proteínas (RP).

Existem vários métodos para determinar o grau de hidrólise, sendo os mais comuns o pH-stat, ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), ácido tricloroacético nitrogênio solúvel (SN-TCA) e métodos de titulação de formaldeído. O método pH-stat é baseado no número de prótons liberados durante a hidrólise. Os métodos de titulação de TNBS e formaldeído são baseados na medição de grupos amino gerados a partir da hidrólise. O método SN-TCA mede a quantidade de nitrogênio solúvel em TCA, ao invés do grau de hidrólise (RUTHERFURD, 2010).

O pH-stat é o método mais simples e mais utilizado, sendo que a precisão do método depende do tipo de enzima utilizada, do tamanho dos peptídeos hidrolisados e da temperatura de reação. Durante a hidrólise da ligação peptídica um grupamento carboxila e um amina são liberados (MARGOT; FLASCHELB; RENKEN, 1994).

Tabela 2 - Condições de hidrólise enzimática para diferentes substratos proteicos.

Substrato	Enzima	Condições estudadas				Observações	Autores
		T (°C)	pH	E/S	%S		
Caseína de leite de Iaque	Proveniente de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	45	7	2 (%)	5	GH de aproximadamente 8% em 12 h de reação.	JIANG et al. (2007)
Caseína bovina	Proveniente de <i>Bacillus</i> sp. P45	45	8	0,8 (U/mL)	0,5	GH de 9% em 7 h de reação.	HIDALGO et al. (2012)
Tilápia (<i>Oreochromis</i> spp.)	Alcalase	44,9-70,1	8	0,16 - 1,84 (%)	5	Os resultados mostraram que, em 80 min de reação, a hidrólise em 57,6 °C e E/S 1,2% foram as condições ideais para obter o maior GH de 10,9%.	MOHAMMAD; KUMAR; BASHA (2014)
Plasma bovino	Alcalase	60	8	8 (%)	0,8	O GH foi acompanhado ao longo de 120 min, alcançando um GH de 19,1%.	GÓMEZ-SAMPEDRO; ZAPATA-MONTOYA (2016)
Resíduo de molho de soja	Mistura de neutrase e papaína (1:3)	45-60	6-10	400 - 7000 (U/g)	4-10	O GH foi de 15,5% na condição otimizada de E/S 6000 U/g, pH 7,8; 50 °C e 4% de substrato em 4 h de reação.	CHEN et al. (2017)
Subprodutos e processamento de camarão	Alcalase	50	8	1000 (U/g)	0,05	O GH foi de aproximadamente 35% em 6 h de hidrólise.	HUANG; ZHAO; JIANG (2011)

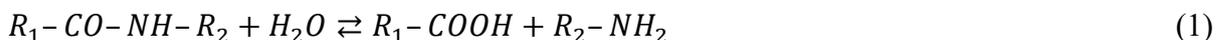
Tabela 2 - Condições de hidrólise enzimática para diferentes substratos proteicos. Continuação

Substrato	Enzima	Condições estudadas				Observações	Autores
		T (°C)	pH	E/S	%S		
Anchova (<i>Clupeonella uliformis</i>)	Promod e Alcalase	50	6,87	1 (%)	50	O GH e a RP para a enzima Promod foram de 37,2% e 55,4% em 1 h de reação e para a alcalase os valores foram de 55,8% e 71,04%, respectivamente.	OVISSIPOUR et al. (2013)
Esturjão Persa (peixe)	Protamex, Flavourzyme e Neutrase	50	7	30 (AU/kg de proteína)	50	Após 18 h de reação, o GH foi de 41,1, 37,5 e 23,3% para as enzimas Protamex, Flavourzyme e Neutrase e a RP foi de 79,4; 64,4 e 81,6%, respectivamente.	OVISSIPOUR et al. (2009)
Vísceras de choco (molusco) e sardinha	Alcalase e Protamex	50	8	1,5 (%)	100	O GH e a RP para vísceras de choco foram de 3,2% e 57,2% usando Protamex e 7% e 64,3% usando Alcalase, respectivamente. Para vísceras de sardinha, GH e a RP foram de 3,1% e 61,2% (usando Protamex) e 3,3% e 60,2 (usando Alcalase), respectivamente.	KECHAOU et al. (2009)
Penas	Savinase Ultra 16L	55	8,5	2,6%	4	A RP em 4 h de reação foi de 5%.	CHEONG et al. (2018)

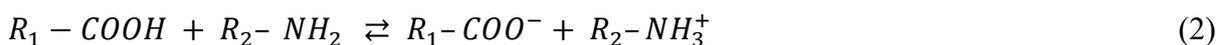
T: Temperatura; E/S: Razão enzima/substrato; %S: Concentração de substrato; GH: Grau de hidrólise; RP: Recuperação de proteína

As etapas de reação de hidrólise proteica são apresentadas a seguir (MÁRQUEZ; VÁZQUEZ, 1999).

Abertura da ligação peptídica:



Troca de prótons:



Dissociação ácida de ambos grupos terminais:



Titulação dos grupos aminos



Os prótons livres resultantes causam uma diminuição no pH da mistura reacional e a adição de base é necessária para manter o pH. A quantidade de base necessária tem uma relação com o número de ligações peptídicas hidrolisadas e pode ser usada para estimar o grau de hidrólise. Etapas adicionais posteriores à hidrólise, como precipitação e centrifugação, são necessárias para os métodos baseados em TNBS e para o método TCA, enquanto que o método pH-stat elimina a necessidade de etapas adicionais para determinar o GH, por acompanhar a reação de hidrólise do início ao fim através da variação do pH. (MÁRQUEZ; VÁZQUEZ, 1999; RUTHERFURD, 2010). Assim, o método pH-stat, permite o monitoramento em tempo real do grau de hidrólise, mantendo o pH ótimo para as enzimas proteases. Somando-se a isso, ao se utilizar múltiplos intervalos de hidrólise, um maior grau de precisão pode ser obtido (DARRAGH; MOUGHAN, 2005).

3.6 FRACIONAMENTO DOS HIDROLISADOS

A hidrólise enzimática geralmente é acompanhada da diminuição da massa molar das proteínas já que as mesmas são quebradas em diferentes tamanhos, devido à clivagem das ligações peptídicas (SINHA et al., 2007). Processamentos posteriores à hidrólise podem ser empregados para concentrar e/ou separar os componentes bioativos dos hidrolisados. Os

processos de separação por membranas são muito utilizados na indústria para concentração e fracionamento de proteínas de hidrolisados proteicos (ZIN et al., 2016). Técnicas de fracionamento dos hidrolisados podem resultar em frações peptídicas com maior atividade antioxidante. A técnica de ultrafiltração é um processo eficiente e de simples operação, ressaltando a grande facilidade de ampliação de escala para a concentração de peptídeos (WIRIYAPHAN et al., 2015).

Membranas de ultrafiltração possuem poros que variam de 5 a 100 nm, retendo moléculas de massa molar na faixa de 1 kDa a 1 MDa, que se acumulam sobre a superfície da membrana (CUI, 2005). O fluxo através da membrana é controlado mediante a pressão exercida sobre o líquido a ser filtrado. Uma das variáveis mais importantes nesta técnica de separação é o fluxo do permeado, definido como a velocidade de transporte através da membrana em unidades de massa ou volume por área de permeação por tempo (ROBERTO et al., 1995).

O desempenho da ultrafiltração é limitado devido à formação de incrustações da membrana (*fouling*) e devido à polarização de concentração, que provocam um decréscimo no fluxo de filtrado. Os principais fenômenos que constituem a formação de *fouling* são adsorção das moléculas do soluto na superfície da membrana e/ou no interior dos poros, entupimento dos poros por moléculas ou partículas em suspensão e o depósito de material em suspensão sobre a superfície da membrana. A polarização de concentração ocorre devido ao aumento da concentração das espécies retidas próximo à superfície da membrana, podendo ser reversível (BAI; LEOW, 2002; ZIN et al., 2016).

Ngo, Ryu e Kim (2014) hidrolisaram a gelatina da pele de bacalhau com a enzima Alcalase e fracionaram em diferentes membranas (<1, 1-5, 5-10 e >10 kDa). Os resultados obtidos mostraram que as amostras de menor massa molar foram as de maior efeito anti-hipertensivo. O hidrolisado de batata doce, também hidrolisado pela enzima Alcalase, foi separado em três frações (>10, 3-10 e <3 kDa) e foi observado que a menor fração apresentou a maior atividade antioxidante pelo método de ORAC e também maior habilidade quelante de Fe^{2+} (ZHANG; MU, 2017). Resultados semelhantes também foram observados em hidrolisados de proteína de peixe-areia (JANG; LICEAGA; YOON, 2016) e semente de cerejeira chinesa (GUO et al., 2015), que fracionados nas membranas de 10, 5 e 3 kDa apresentaram maior atividade antioxidante pelo método DPPH nas frações <3 kDa.

3.7 PROPRIEDADE DOS HIDROLISADOS PROTEICOS

Os hidrolisados proteicos têm sido utilizados desde 1940 com finalidades médicas na preparação de dietas especiais. Na década de 70 assistiu-se a um expressivo crescimento nos métodos de preparação e uso de hidrolisados proteicos, tanto com finalidades clínica e nutricional como para a melhoria de propriedades funcionais de proteínas (CLEMENTE, 2000).

A utilização da hidrólise enzimática, voltada ao aproveitamento de subprodutos do abate animal, já é alvo de estudos. Utilizando vísceras do peixe-gato no preparo de hidrolisados proteicos, os autores observaram elevada quantidade de aminoácidos essenciais (45%), sendo a arginina e lisina os aminoácidos predominantes, mostrando que estes hidrolisados são um boa fonte de peptídeos (KLOMKLAO; KISHIMURA; BENJAKUL, 2013). A utilização de resíduos do processamento de tilápia também foi estudada por Dieterich et al. (2014), onde foi desenvolvido o hidrolisado proteico para uso como ração animal.

Outros trabalhos se referem à obtenção de hidrolisados proteicos de subprodutos do abate bovino, onde enzimas de origem vegetal foram utilizadas para hidrolisar o plasma sanguíneo, com o intuito de estudar as atividades antioxidantes e antimicrobianas *in vitro*, resultando em hidrolisados com propriedades antioxidantes elevadas e sequências peptídicas únicas (BAH et al., 2016). As propriedades funcionais apresentadas pelos hidrolisados proteicos resultantes da hidrólise enzimática são dependentes de diversos fatores, como a natureza do substrato, especificidade da enzima usada, condições de hidrólise (KUMAR; NAZEER; GANESH, 2012; PEINADO; KOUTSIDIS; AMES, 2016). Os peptídeos encontrados em hidrolisados proteicos têm apresentado diversas propriedades físico-químicas e atividades biológicas, as quais dependem de sua sequência de aminoácido e massa molar (SARMADI; ISMAIL, 2010).

O estabelecimento de uma correlação geral entre o grau de hidrólise e as propriedades dos hidrolisados é complexa, uma vez que os resultados diferem entre as metodologias de determinação de grau de hidrólise, entre as diferentes condições de reação e principalmente frente aos diferentes substratos possíveis. Uma forma mais genérica de correlação, e que seja mais passível, é a comparação entre características de hidrolisados que usem a mesma metodologia de determinação de grau de hidrólise e substratos iguais (MORAIS et al., 2013; SPELLMAN et al., 2003).

Os peptídeos bioativos presentes no interior de uma molécula de proteína são definidos como uma sequência de aminoácidos inativos. Entretanto, quando são liberados através da hidrólise exercem determinadas atividades biológicas. Diversas propriedades

funcionais dos hidrolisados proteicos já foram estudadas, destacando-se atividades anti-hipertensivas (CONTRERAS et al., 2011), antimicrobianas (CORRÊA et al., 2011; THÉOLIER et al., 2014), imunomoduladoras (STUKNYTE et al., 2011), anti-inflamatórias (MUKHOPADHYA et al., 2014) e antioxidantes (BAH et al., 2015; NIMALARATNE; BANDARA; WU, 2015; OLIVEIRA et al., 2015).

3.7.1 Propriedades antioxidantes dos peptídeos

Antioxidantes são compostos utilizados em pequenas quantidades que previnem ou retardam reações de oxidação, devido à sua capacidade de sequestrar ou evitar a formação de radicais livres (POKORNÝ, 1991). Tais radicais são responsáveis por desenvolver reações em cadeia, pois são moléculas que ao perderem elétrons se tornam instáveis e, conseqüentemente, desestabilizam moléculas adjacentes. Os antioxidantes podem ser de origem sintética ou de origem natural, como é o caso dos antioxidantes gerados pela hidrólise enzimática. A ação dos antioxidantes está correlacionada com o retardamento da degradação de produtos alimentícios (MURAKAMI et al., 2015).

As reações químicas envolvidas na medição da capacidade antioxidante podem ser classificadas como ensaios à base de transferência de átomos de hidrogênio, transferência de elétrons e modo misto. Os métodos de capacidade antioxidante baseados em transferência de elétrons são o FRAP (método da redução do ferro), DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico), TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox), CUPRAC (capacidade antioxidante de compostos redutores) e Folin; e os ensaios baseados em transferência de hidrogênio são o TRAP (poder reativo total), ORAC (método da capacidade de absorção de radicais oxigênio) e o PCL (método utilizando polímero policaprolactona) (CAPANOGLU et al., 2017; MURADOR et al., 2018). A utilidade do método ORAC deve ser observada, uma vez que o radical peroxil está presente nos recursos biológicos e alimentares (MURADOR et al., 2018).

No estudo realizado por Li et al. (2007), hidrolisados de colágeno suíno obtidos por hidrólise enzimática apresentaram atividade antioxidante. Já Herregods et al. (2011) encontraram atividade antioxidante em seqüências de aminoácidos obtidos através da hidrólise enzimática do couro bovino. Rossini et al. (2009) avaliaram hidrolisados de caseína utilizando proteases comerciais quanto às suas capacidades antioxidantes e quando os mesmos foram adicionados à carne bovina moída foram capazes de inibir a oxidação lipídica.

A atividade antioxidante em jussara antes e após o processo de fermentação foi relatada por Braga et al. (2018). Ensaios de atividade antioxidante para ABTS e radicais peroxil (ORAC) foram realizados, a fim de determinar se a mudança na composição das antocianinas afetou esse parâmetro. Considerando o teste ABTS, a jussara fermentada resultou em aumento na atividade antioxidante quando comparada a polpa de jussara *in natura*, de 142,1 a 212,0 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ de amostra, respectivamente. Este efeito também foi confirmado pelo ensaio ORAC, onde a atividade antioxidante aumentou de 46,3 para 88,3 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ de amostra; com o estudo foi possível concluir que a jussara fermentada apresentou aumento da atividade antioxidante em relação à polpa *in natura* em ambos os ensaios antioxidantes.

Fakhfakh et al. (2011) demonstraram que a farinha de penas hidrolisada durante o cultivo por *Bacillus pumilus* contém aminoácidos e peptídeos que possuem capacidade antioxidante. Lemes et al. (2016) mostraram que durante o cultivo de *Bacillus* sp. P45 o uso de farinha de penas e biomassa residual de levedura gerada durante a produção intracelular da enzima β -galactosidase resultaram em biomoléculas com potencial antioxidante.

Para a enzima de *Chryseobacterium* sp. kr6, Oliveira et al. (2014) observaram que o hidrolisado de proteína de soja apresentou maior atividade antioxidante por ABTS no valor de 42,83% quando utilizado pH 8, 45 °C e razão E/S de 8000 U/g. Para a proteína de ovo houve um decréscimo da capacidade antioxidante analisada pelo método de ORAC, ao aumentar a concentração enzimática de 20 para 40 U/mL a atividade antioxidante apresentou um decréscimo de 509,47 para 457,76 $\mu\text{mol TE}/\text{g}$, respectivamente (CASTRO; SATO, 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SUBSTRATO PROTEICO

As penas de aves utilizadas para a obtenção da farinha foram cedidas pela empresa Danby Cosulati, localizada em Morro Redondo-RS. A farinha de penas utilizada tanto no cultivo como na hidrólise enzimática foi obtida através da lavagem das penas, tratamento térmico de 121 °C com pressão de 1,1 atm por 30 min e secagem em estufa de circulação de ar na temperatura de 50 °C (adaptado de BERTSCH; COELLO, 2005). Após, as penas foram moídas em moinho de facas, sendo padronizadas quanto à sua granulometria em peneira de mesh 20 (partículas $\leq 0,850$ mm).

4.2 OBTENÇÃO DA ENZIMA

O micro-organismo utilizado para a obtenção da enzima proteolítica foi *Bacillus* sp. P45. Este micro-organismo possui registro no GenBank, com o número de acesso AY962474, e enquadra-se no grupo de *Bacillus subtilis*, reconhecido sob certificação GRAS (SIRTORI et al., 2006). A cepa foi cedida pelo Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, Porto Alegre). A cultura foi mantida a 4°C em ágar BHI (ágar infusão de cérebro e coração) (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009).

O inóculo foi preparado incubando-se a bactéria em ágar BHI a 30 °C por 24 h. A cultura foi raspada da superfície do ágar e adicionada a uma solução estéril de NaCl 0,85% (m/v) até a suspensão atingir absorvância de 0,5 a 600 nm (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011). A enzima foi produzida por cultivo submerso conforme Daroit, Corrêa e Brandelli (2011), em um meio mineral contendo farinha de penas como substrato (43 g/L), NH₄Cl (1,9 g/L), NaCl (0,5 g/L), K₂HPO₄ (0,3 g/L) e KH₂PO₄ (0,4 g/L). O pH inicial do meio foi ajustado em 7,0 e o cultivo iniciado com 1% (v/v) de inóculo. As condições de cultivo foram de 30 °C, 125 rpm por 48 h. Ao término do cultivo, o extrato enzimático com células foi centrifugado (4700 × g, 20 min) e o sobrenadante foi liofilizado e utilizado como fonte de proteases (protease bruta).

4.3 ENSAIOS DE HIDRÓLISE DA FARINHA DE PENAS

4.3.1 Preparo da solução enzimática e do substrato

A solução enzimática da protease foi preparada solubilizando a protease liofilizada em tampão Tris-HCl (100 mmol/L, pH 7,5). O substrato (farinha de penas) foi homogeneizado em água destilada e mantido sob agitação magnética constante durante 8 h previamente à hidrólise. Antes da adição do extrato enzimático, o pH foi ajustado para 7,5 com NaOH 0,2 mol/L ou HCl 0,2 mol/L.

4.3.2 Escolha do sistema reacional

Os ensaios de hidrólise ocorreram em dois sistemas reacionais: incubadora rotatória e reator encamisado. Em incubadora rotatória foram utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL com agitação constante de 150 rpm e a temperatura ajustada para a condição de cada ensaio. Os ensaios em reator encamisado (capacidade de 100 mL) foram realizados sob agitação magnética constante e a temperatura do banho de recirculação de água foi ajustada para a condição de cada ensaio (GONÇALVES, 2016).

Os ensaios foram realizados utilizando-se 25 g/L de proteínas em solução, 40 °C e razão E/S de 600 U/g de proteína, condições estabelecidas previamente por Gonçalves (2016) na hidrólise do plasma sanguíneo, utilizando a protease de *Bacillus* sp. P45.

O volume do meio reacional foi de 50 mL, contendo 48 mL de solução do substrato e 2 mL de extrato enzimático. Foram realizados ensaios controle (branco), onde o extrato enzimático foi substituído por tampão Tris-HCl (100 mmol/L, pH 7,5). Os ensaios de hidrólise foram realizados em triplicata.

Após a adição da enzima na solução contendo o substrato, as reações de hidrólise foram conduzidas por 6 h (OLIVEIRA et al., 2015) e 8 h (GONÇALVES, 2016). O pH foi corrigido para 7,5 com NaOH 0,2 mol/L a cada hora até o término do ensaio. Os volumes de titulante foram registrados para a determinação do grau de hidrólise (GH). Ao final das 8 h de reação, os hidrolisados foram aquecidos a 85 °C por 5 min para inativação enzimática e o material utilizado para a análise de proteínas solúveis foi centrifugado a $21.380 \times g$ por 15 min para remoção do material suspenso.

Os ensaios foram realizados em triplicata com ajuste de pH em ambos sistemas reacionais, em intervalos de 1 h. Ensaios sem ajuste de pH na incubadora rotatória também

foram realizados, além de ensaios controle (branco) para cada condição. As respostas analisadas foram o grau de hidrólise (GH) e a recuperação de proteína (RP).

4.3.3 Maximização dos ensaios de hidrólise

A maximização das condições da hidrólise da farinha de penas foi realizada através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^4 com pontos axiais e 4 repetições do ponto central, totalizando 28 ensaios, em reator com agitação magnética constante e ajuste de pH a cada hora durante 8 h de reação. Os 4 parâmetros analisados foram temperatura de reação ($^{\circ}\text{C}$), razão de enzima/substrato (U/g de proteína), concentração de proteína do substrato (g/L) e a concentração de CaCl_2 (mmol/L) no extrato enzimático, cujos níveis foram variados conforme a Tabela 3, tendo como respostas o grau de hidrólise (GH) e a recuperação de proteínas (RP).

Tabela 3 - Valores codificados e reais das variáveis independentes utilizadas no planejamento experimental.

Níveis	Variáveis independentes			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
-2	0	35	600	10,0
-1	25	40	1950	17,5
0	50	45	3300	25,0
1	75	50	4650	32,5
2	100	55	6000	40,0

X₁: CaCl_2 (mmol/L); X₂: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$); X₃: razão E/S (U/g de proteína); X₄: Concentração de proteína do substrato (g/L)

Os resultados obtidos com o DCCR 2^4 foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com 90% de confiança ($p < 0,1$).

4.3.4 Validação do modelo

Após o término do planejamento experimental, foi realizada a validação de 3 condições reacionais, sendo duas delas indicadas pelas curvas de contorno e a terceira por apresentar os maiores valores de GH e RP no planejamento experimental. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4 GRAU DE HIDRÓLISE

O grau de hidrólise (GH) foi estimado pelo método pH-stat, segundo Adler-Nissen (1986), como sendo o número de ligações peptídicas hidrolisadas, expresso em equivalentes de hidrólise (h), em relação ao número total de ligações peptídicas antes da reação (h_{tot}), calculado pela Equação 6.

$$GH(\%) = \frac{V_B \times N_B}{\alpha \times h_{tot} \times m_p} \times 100 \quad (6)$$

onde V_B é o volume consumido de NaOH durante a hidrólise (mL); N_B é a molaridade de NaOH (mol/L); α é o grau de agrupamentos amino liberados pela hidrólise; m_p é a massa de proteína do substrato proteico (g); h_{tot} é o número total de ligações peptídicas por unidade de massa (mol/kg). Para a maioria das proteínas, h_{tot} corresponde a 8 mols equiv/kg de proteína, estimado com base na composição de aminoácidos. No caso de proteínas de pena, o valor é 8,1 mols equiv/kg de proteína (ADLER-NISSEN, 1986; ZARAÏ JAOUADI et al., 2012).

Quando uma ligação peptídica é hidrolisada a pH superior a 6,5, o grupo carboxiterminal formado contribui para o abaixamento do pH. O grau de grupamentos liberados na hidrólise pode ser estimado pela Equação 7, considerando que o pK médio dos grupos amino seja constante, deverá existir uma proporcionalidade entre a liberação de prótons (igual ao consumo de base) e a quantidade de ligações peptídicas clivadas. O fator de proporcionalidade é o grau de dissociação dos grupos α -amino (α) (STEINHARDT; BEYCHOK, 1964):

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1+10^{pH-pK}} \quad (7)$$

Os valores de pK para diferentes temperaturas podem ser estimados segundo a Equação 8 (DINIZ; MARTIN, 1996):

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298 + T} \times 2400 \quad (8)$$

onde pH é o valor de pH estabelecido para o método de pH-stat; pK é a constante de dissociação ácida do grupamento amino e T é a temperatura na hidrólise na escala absoluta Kelvin.

4.5 RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNAS

A recuperação de proteína (*RP*) é definida pela razão entre a massa de proteína no sobrenadante do hidrolisado e a massa inicial de proteínas no substrato previamente a hidrólise (KETNAWA; LICEAGA, 2017).

$$RP(\%) = \frac{Mp}{Mp_i} \times 100 \quad (9)$$

onde *Mp* é a quantidade de proteínas no sobrenadante do hidrolisado (g) e *Mp_i* é a quantidade de proteína total oriunda da farinha de penas antes da hidrólise (g).

4.6 FRACIONAMENTO DOS HIDROLISADOS

O hidrolisado obtido foi centrifugado a $21.380 \times g$ por 30 min para remoção do material suspenso e o sobrenadante foi fracionado utilizando uma célula de ultrafiltração (Advantec, UHP-76, Japão) com capacidade de 300 mL e com agitação magnética. O processo foi realizado sob pressão de $4,2 \text{ kgf/cm}^2$ aplicada com gás nitrogênio e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. As membranas com massa molar de corte de 10 kDa e 3 kDa foram utilizadas em sequência no fracionamento. O ponto final da ultrafiltração foi definido como a redução em cinco vezes do volume alimentado de hidrolisado. As membranas foram inicialmente compactadas aplicando os mesmos parâmetros de operação, com água, até obter fluxo constante e posteriormente foi ultrafiltrado o hidrolisado. Após a ultrafiltração, as frações foram liofilizadas para a determinação da atividade antioxidante.

4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.7.1 Método da capacidade sequestradora do radical ABTS^{•+}

Para determinação da atividade antioxidante utilizando o método de ABTS, 30 μL dos extratos preparados com acetona 80% (v/v) foram adicionados em 3 mL da solução de radical ABTS^{•+} e a absorvância da reação foi lida em espectrofotômetro a 734 nm após 6 min. Neste ensaio foi utilizado o radical livre ABTS^{•+}, obtido pela reação de 5 mL de ABTS (7 mmol/L) com 88 μL de persulfato de potássio 140 mmol/L, conforme método descrito por RE et al. (1999). O sistema foi mantido em repouso, a temperatura ambiente, por 16 h, em

ausência de luz. Uma vez formado o radical $ABTS^{\bullet+}$, o mesmo foi diluído com etanol absoluto até a obtenção de valor de absorvância de $0,7 \pm 0,05$ a 734 nm. A quantificação da atividade antioxidante total foi realizada a partir de curva padrão de Trolox em etanol, nas mesmas condições reacionais. Os resultados foram expressos em μmol de Trolox (TE) por g de amostra.

4.7.2 Determinação da capacidade antioxidante pelo ensaio ORAC

Para determinação da atividade antioxidante frente ao radical peroxila foi utilizado o método ORAC (capacidade de absorção de radicais oxigênio), baseado na formação de radicais peroxila pela degradação térmica do AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano)di-hidroclorato) à 37 °C. 150 μL de fluoresceína (61 nmol/L, preparada em tampão fosfato 75 mmol/L pH 7,4) foram adicionados em microplacas cor preta de 96 poços, seguidos de 25 μL do extrato preparado em acetona 80% (v/v) (diluído 10, 50, 500 vezes em tampão fosfato) ou branco (tampão) ou solução padrão de Trolox (50 $\mu\text{mol/L}$). A placa foi incubada por 10 min a 37 °C, sob agitação intermitente, e após foram adicionados 25 μL de solução de AAPH (19 mmol/L, preparado em tampão fosfato) em cada poço. As leituras da fluorescência a 538 nm (excitação a 485 nm) foram realizadas a cada minuto, em triplicata durante 180 min (RODRIGUES et al., 2012). Os resultados foram expressos em μmol de Trolox (TE) por g de amostra.

4.8 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.8.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada conforme metodologia descrita por Daroit, Corrêa e Brandelli (2009), em que o substrato utilizado foi a azocaseína 1% (m/v) em tampão tris-HCl (100 mmol/L, pH 7,5). A mistura reacional foi composta por 100 μL de tampão tris-HCl (100 mmol/L, pH 7,5), 300 μL de azocaseína e 100 μL da solução enzimática. A mistura foi incubada em banho com agitação a 40 °C durante 30 min e finalizada pela adição de 600 μL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v). A mistura foi centrifugada ($4700 \times g$ por 20 min) e 800 μL do sobrenadante foram adicionados a 200 μL de NaOH 1,8 mol/L. A transmitância foi medida a 420 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que causa a mudança de 0,1 unidades de absorvância sob as condições do ensaio.

4.8.2 Determinação do teor de proteínas

O teor de proteínas da farinha de penas foi determinado pelo método de Micro-Kjeldahl, segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). O fator 6,25 foi utilizado para a conversão do nitrogênio em proteína (PATINVOH et al., 2016).

Os teores de proteína solúvel dos hidrolisados proteicos da farinha de penas foram avaliados pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando uma curva padrão de albumina bovina. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da comparação da RP entre 6 h e 8 h em incubadora rotatória e reator, foram submetidos a teste de diferença de médias, teste t, com 95% de confiança para determinação da diferença estatística entre os ensaios propostos. Os demais ensaios foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo Teste de Tukey, onde as diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE PROTEASE DE *Bacillus* sp. P45

O extrato enzimático liofilizado obtido a partir do cultivo de *Bacillus* sp. apresentou atividade enzimática de 40.479 U/g. A partir deste valor foi possível determinar a quantidade de enzima a ser adicionada no preparo das soluções enzimáticas.

5.2 ESCOLHA DO SISTEMA REACIONAL

A estratégia utilizada inicialmente para atingir maiores valores de GH e de RP foi comparar os efeitos da hidrólise em 6 e 8 h de reação, com e sem ajuste de pH e a utilização de dois sistemas reacionais (incubadora rotatória e reator encamisado). A Figura 1 apresenta os valores de grau de hidrólise (GH) durante a reação em ambos sistemas reacionais em que os valores de pH foram corrigidos para o valor inicial (7,5) a cada de hora, enquanto que a recuperação de proteínas (RP) é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 - Recuperação de proteínas em 6 e 8 h de reação com e sem ajuste de pH.

Ensaio	Recuperação de proteína (%)	
	6 h	8 h
Incubadora com ajuste de pH	12,1 ± 0,4 ^{a,B}	12,5 ± 0,3 ^{a,B}
Incubadora sem ajuste de pH	8,8 ± 0,2 ^{b,C}	11,9 ± 0,2 ^{a,C}
Reator com ajuste de pH	14,2 ± 0,3 ^{b,A}	16,2 ± 0,2 ^{a,A}

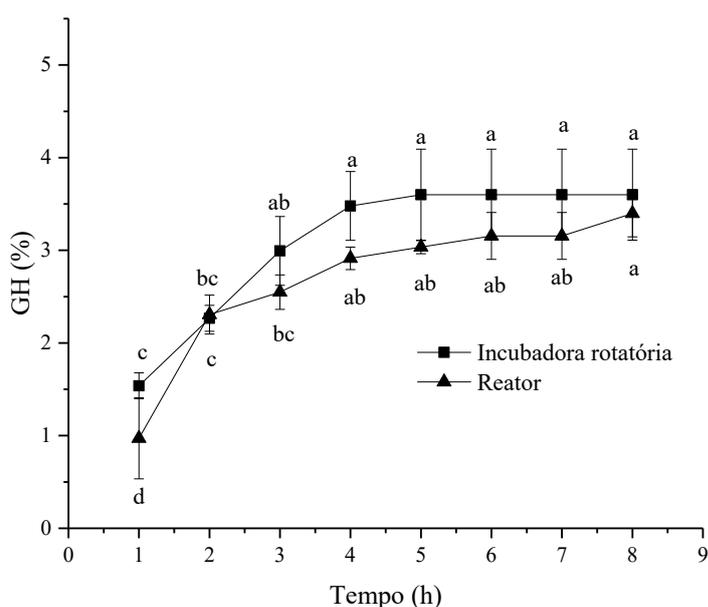
Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste t, $p > 0,05$ e $n=3$). Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste de Tukey, $p > 0,05$ e $n=3$).

Nos ensaios realizados na incubadora rotatória foi possível verificar que a recuperação de proteínas (Tabela 4) foi maior estatisticamente na reação onde houve ajuste de pH em intervalos de 1 h, tanto em 6 h como em 8 h de reação. No entanto, na reação onde houve ajuste de pH, não há diferença significativa em 6 h e 8 h de hidrólise. A enzima da protease P45 possui atividade máxima em pH 7, enquanto que condições ácidas diminuem a atividade enzimática em torno de 50%, em valores de pH 6 (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011). Assim, os prótons livres resultantes da reação de hidrólise causam uma diminuição no pH da

mistura reacional e a influência do pH se manifesta principalmente na atividade da enzima, ocasionando provavelmente esta menor recuperação de proteínas. Nos experimentos de hidrólise conduzidos em reatores encamisados com sistema de agitação magnética e ajuste de pH, é possível verificar que a RP foi estatisticamente maior tanto em 6 h de reação, quanto em 8 h, quando comparada aos ensaios de hidrólise realizados em incubadora rotatória. Uma razão para a RP ter sido maior na hidrólise realizada em reator pode ser explicada pela força de cisalhamento (PALMQVIST; WIMAN; LIDÉN, 2011) da agitação magnética proporcionar maior solubilização de peptídeos, oportunizando maiores valores de RP, quando comparada com a agitação orbital presente na incubadora rotatória. A maior RP foi observada em 8 h de reação, atingindo o valor de 16,2%. Devido ao fato de que em incubadora rotatória os resultados foram mais satisfatórios com ajuste de pH, não foram realizados experimentos sem ajuste de pH nos reatores encamisados.

Na Figura 1, observa-se que para os dois sistemas reacionais, o GH para a incubadora rotatória alcança um valor de 3,6% e no reator 3,3% em 8 h de reação. O valor de GH já se encontra estabilizado em 3 e 4 h de reação para a incubadora rotatória e reator encamisado, respectivamente, porém, como há diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% de significância em comparação a RP em 8 h de hidrólise em incubadora rotatória e no reator encamisado (Tabela 4), a reação deve ser conduzida até 8 h para atingir o valor máximo das duas respostas.

Figura 1 - Grau de hidrólise para a incubadora rotatória e reator em 8 h de reação.



Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa entre as médias. (Teste de Tukey, $p > 0,05$ e $n = 3$).

Nos ensaios realizados é possível verificar que a protease de *Bacillus* sp. P45 pode ser empregada para a hidrólise de farinha de penas, sendo capaz de hidrolisar a mesma. As diferentes condições testadas indicam que a melhor condição acontece utilizando reator encamisado com ajuste de pH para 7,5 em um tempo de reação de 8 h, visto que, nesta condição, há diferença estatística na RP ao nível de 5% de significância quando comparada com a reação em 6 h.

5.3 MAXIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FARINHA DE PENAS

A estratégia utilizada para atingir a maximização do GH e da RP foi avaliar os efeitos da temperatura de reação (°C), razão E/S (U/g de proteína), concentração de proteína do substrato (g/L) e a concentração de CaCl₂ (mmol/L) no extrato enzimático, através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2⁴ com 4 pontos centrais. Na Tabela 5 é apresentado a matriz do DCCR 2⁴, onde também são apresentadas o grau de hidrólise e a recuperação de proteínas obtidas para cada ensaio. É possível verificar uma variação nas respostas, com GH entre 3,2% (ensaio 18) a 8,3% (ensaio 8) e a RP entre 12,4% (ensaio 10) e 38,1% (ensaio 8).

5.3.1 Grau de hidrólise

Na Tabela 6 estão apresentados os coeficientes de regressão das variáveis estudadas bem como as suas interações para o GH, considerando um nível de significância de 90% ($p < 0,1$). As variáveis concentração de CaCl₂ (Q), razão enzima/substrato (L), concentração proteica de substrato (L) e a interação da temperatura com a razão enzima/substrato influenciaram significativamente o GH. As demais variáveis não significativas foram adicionadas ao resíduo para o cálculo da análise de variância (ANOVA) conforme Tabela 7.

A partir da análise dos coeficientes de regressão foi possível gerar a equação do modelo com as variáveis codificadas que representam o comportamento do GH. A partir da Equação 10 foi possível calcular os valores preditos e consequentemente os desvios relativos (Tabela 5), que foram relativamente altos nos pontos axiais, chegando a cerca de 34%. Sendo assim, o modelo não descreve adequadamente estas regiões. Porém, nos pontos de maior GH, o desvio é menor. Os desvios relativos para o GH variaram de 1% (condição 9) a 42,7% (condição 4), conforme apresentado.

Tabela 5 - Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2⁴, valores codificados e reais (entre parênteses), grau de hidrólise e recuperação de proteínas em 8 h de hidrólise.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	GH	DR1	RP	DR2
1	-1 (25)	-1 (40)	-1 (1950)	-1 (17,5)	5,7	-3,5	18,1	12,8
2	1 (75)	-1 (40)	-1 (1950)	-1 (17,5)	7,2	18,1	15,7	-0,5
3	-1 (25)	1 (50)	-1 (1950)	-1 (17,5)	5,8	11,4	27,6	12,7
4	1 (75)	1 (50)	-1 (1950)	-1 (17,5)	3,6	-42,7	28,9	16,6
5	-1 (25)	-1 (40)	1 (4650)	-1 (17,5)	6,4	-1,0	24,9	9,2
6	1 (75)	-1 (40)	1 (4650)	-1 (17,5)	7,2	10,3	24,8	8,9
7	-1 (25)	1 (50)	1 (4650)	-1 (17,5)	7,7	6,2	37,5	17,6
8	1 (75)	1 (50)	1 (4650)	-1 (17,5)	8,3	13,0	38,1	18,9
9	-1 (25)	-1 (40)	-1 (1950)	1 (32,5)	4,3	1,0	17,7	10,8
10	1 (75)	-1 (40)	-1 (1950)	1 (32,5)	5,0	14,8	12,4	-27,3
11	-1 (25)	1 (50)	-1 (1950)	1 (32,5)	4,0	12,6	22,5	-7,1
12	1 (75)	1 (50)	-1 (1950)	1 (32,5)	3,9	10,4	28,3	14,8
13	-1 (25)	-1 (40)	1 (4650)	1 (32,5)	5,5	12,4	20,2	-11,9
14	1 (75)	-1 (40)	1 (4650)	1 (32,5)	5,5	12,4	21,6	-4,6
15	-1 (25)	1 (50)	1 (4650)	1 (32,5)	4,9	-13,9	27,0	-14,5
16	1 (75)	1 (50)	1 (4650)	1 (32,5)	4,9	-13,9	31,5	1,9
17	-2 (0)	0 (45)	0 (3300)	0 (25,0)	4,2	-0,4	21,9	-6,6
18	2 (100)	0 (45)	0 (3300)	0 (25,0)	3,2	-31,8	17,4	-34,2
19	0 (50)	-2 (35)	0 (3300)	0 (25,0)	5,4	-6,3	14,3	-5,1
20	0 (50)	2 (55)	0 (3300)	0 (25,0)	4,3	-33,5	21,2	-49,4
21	0 (50)	0 (45)	-2 (600)	0 (25,0)	4,5	1,9	13,7	-20,7
22	0 (50)	0 (45)	2(6000)	0 (25,0)	7,0	-0,9	27,4	-10,1
23	0 (50)	0 (45)	0 (3300)	-2 (10,0)	7,2	-2,5	23,6	-1,1
24	0 (50)	0 (45)	0 (3300)	2 (40,0)	4,3	4,7	24,2	3,5
25	0 (50)	0 (45)	0 (3300)	0 (25,0)	5,6	-2,5	23,2	-0,6
26	0 (50)	0 (45)	0 (3300)	0 (25,0)	5,3	-8,3	23,7	1,5
27	0 (50)	0 (45)	0 (3300)	0 (25,0)	5,1	-12,6	23,6	1,1
28	0 (50)	0 (45)	0 (3300)	0 (25,0)	5,6	-2,5	22,8	-2,4

X₁: CaCl₂(mmol/L); X₂: Temperatura (°C); X₃: razão E/S (U/g de proteína); X₄: Concentração de proteína do substrato (g/L); GH: Grau de hidrólise; DR1: Desvio relativo (%) do GH; RP: Recuperação de proteína; DR2: Desvio relativo (%) da RP.

A verificação da validade do modelo obtido foi realizada através da Análise de Variância (ANOVA), Tabela 7, onde a validade do modelo foi observada pelo teste *F* e coeficiente de correlação (*R*). O coeficiente de correlação (*R*) para o modelo ajustado para o grau de hidrólise foi de 0,845. Este valor indica que o modelo obtido explica aproximadamente 84,5% da variação dos dados observados no GH. O *F*_{calculado} foi cerca de 6 vezes maior que o

F_{tabelado} . A partir do modelo foi possível construir as curvas de contorno, que expressam a interação entre duas variáveis sobre as respostas.

Tabela 6 - Coeficiente de regressão, erro padrão e nível de significância (p) para o grau de hidrólise.

Variável	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t (13)	p-valor
Média*	5,40	0,38	14,16	<0,01
X ₁ (L)	-0,03	0,31	-0,19	0,85
X ₁ (Q)*	-0,32	0,31	-2,08	0,06
X ₂ (L)	-0,25	0,31	-1,58	0,14
X ₂ (Q)	-0,04	0,31	-0,23	0,82
X ₃ (L)*	0,66	0,31	4,26	<0,01
X ₃ (Q)	0,19	0,31	1,21	0,25
X ₄ (L)*	-0,82	0,31	-5,27	<0,01
X ₄ (Q)	0,19	0,31	1,21	0,25
X ₁ X ₂	-0,29	0,38	-1,54	0,15
X ₁ X ₃	0,09	0,38	0,49	0,63
X ₁ X ₄	-0,01	0,38	-0,03	0,97
X ₂ X ₃ *	0,38	0,38	2,00	0,07
X ₂ X ₄	-0,09	0,38	-0,49	0,63
X ₃ X ₄	-0,23	0,38	-1,21	0,25

* Efeito significativo ($p < 0,1$); X₁: CaCl₂ (mmol/L); X₂: Temperatura (°C); X₃: razão E/S (U/g de proteína); X₄: Concentração de proteína do substrato (g/L).

Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) do DCCR 2⁴ para o grau de hidrólise.

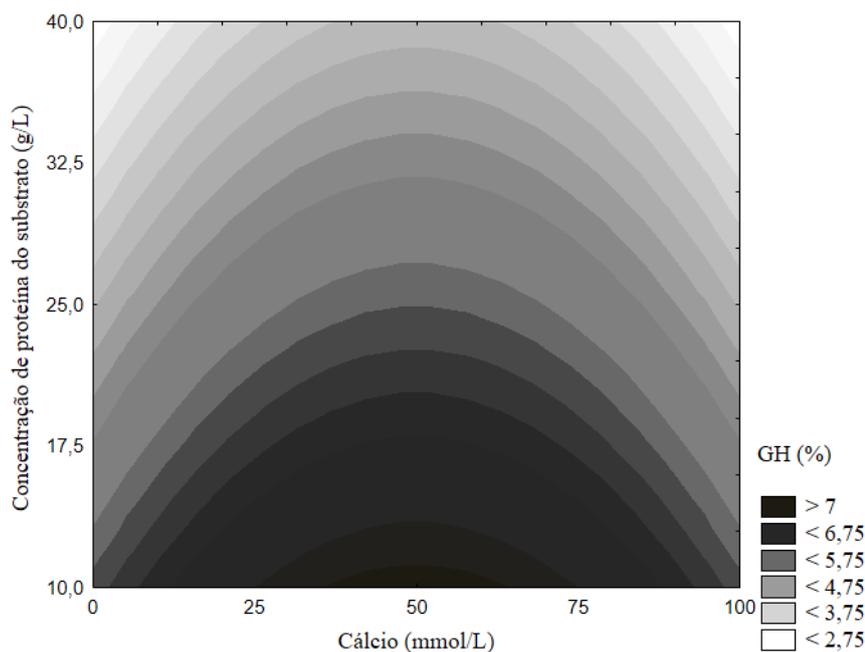
Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	R
Regressão	33,00	4	8,25	14,32	0,845
Resíduo	13,25	23	0,58		
Total	46,25	27			

F_{0,1;4,23;2,21}

$$GH(\%) = 5,74 - 0,38X_1^2 + 0,66X_3 - 0,82X_4 + 0,38X_2X_3 \quad (10)$$

onde X_1 é a concentração de CaCl_2 no extrato enzimático (mmol/L), X_2 a temperatura ($^\circ\text{C}$), X_3 a razão enzima/substrato (U/g de proteína) e X_4 a concentração proteica de substrato (g/L). As Figuras 2, 3, 4 e 5 apresentam as curvas de contorno geradas a partir do modelo preditivo e significativo.

Figura 2 - Curva de contorno para grau de hidrólise em função da concentração de proteína do substrato e da concentração de cálcio no extrato enzimático.

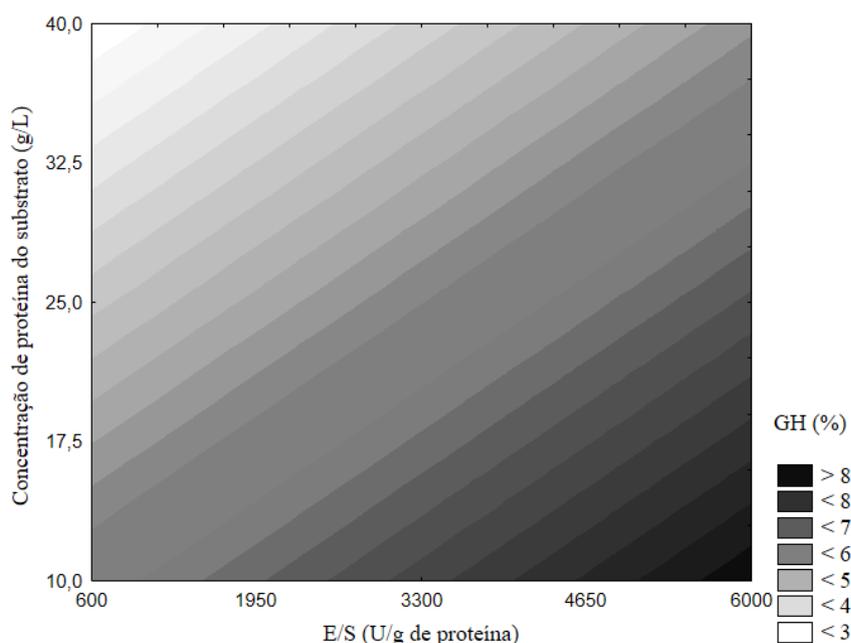


Ao analisar a curva de contorno em função da concentração de proteína do substrato e concentração de CaCl_2 (Figura 2) é possível observar que os maiores graus de hidrólise foram alcançados quando se utilizou uma concentração de 50 mmol/L de CaCl_2 e baixa concentração proteica de substrato (10 g/L). A presença de uma concentração de cálcio estabiliza a enzima frente a mudanças de pH e temperatura. Este comportamento pode ser explicado devido à capacidade que alguns íons salinos possuem em estabilizar a ligação do complexo enzima-substrato e manter a conformação ativa da enzima, protegendo contra a desnaturação térmica (CAO et al., 2009; FAKHFAKH et al., 2009; LEE et al., 2002). Apesar do modelo obtido indicar menores concentrações de proteína do substrato (Figura 2 e 3), deve haver um limite, pois quando a concentração de substrato for muito baixa, a probabilidade de colisões entre o substrato e a protease seria reduzida e a hidrólise também seria inibida (ZHANG et al., 2012).

Na Figura 3 é possível observar a curva de contorno para o GH em função da concentração de proteína do substrato e da razão E/S. Os resultados mostram que o grau de hidrólise diminui com o aumento da concentração de proteína do substrato para 40 g/L e

aumenta conforme a razão E/S aumenta até 6000 U/g. Uma alta concentração de substrato pode reduzir a disponibilidade de água no sistema de reação e os movimentos de difusão da protease e do substrato, inibindo o processo de hidrólise (ZHANG et al., 2012). Comportamento semelhante foi observado por He et al. (2015), que otimizaram a hidrólise enzimática da carne de Amêijoia (*Paphia undulata*), designação comum dada a várias espécies de moluscos, utilizando uma protease de *Bacillus subtilis*. Para isso, os autores avaliaram o efeito das variáveis temperatura (45-55 °C), razão enzima/substrato (3000-5000 U/g) e tempo de reação (2-4 h) sobre o grau de hidrólise e atividade antioxidante. Como resultado, eles obtiveram um modelo, no qual as condições ótimas foram 51°C, 3,14 h e razão enzima/substrato de 4.321 U/g.

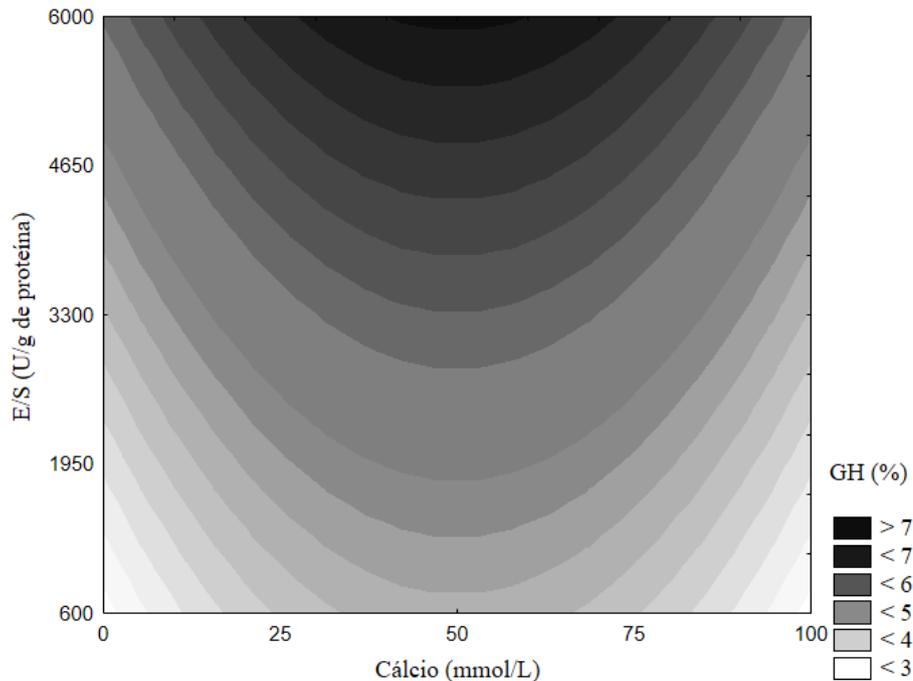
Figura 3 - Curva de contorno para o grau de hidrólise em função da concentração de proteína do substrato e da razão E/S.



Através da Figura 4, verifica-se que maiores relações E/S no valor 6000 U/g de proteína geram maiores valores de GH (>7%) quando se utiliza a concentração de 50 mmol/L de CaCl₂. Quanto à necessidade de cálcio, uma hipótese levantada por Eijssink, Matthews e Vriend (2011) é de que sob algumas circunstâncias a protease é estável e completamente dobrada, enquanto que pode também ser parcialmente desdobrada e suscetível à degradação, sendo esta mudança de estabilidade regulada pela ligação do íon cálcio à enzima. Uma possível causa para a inibição deste valor em maiores concentrações (100 mmol/L) de CaCl₂ é a alteração da estrutura conformacional, gerada pela ruptura da estrutura proteica provocada pelo excesso

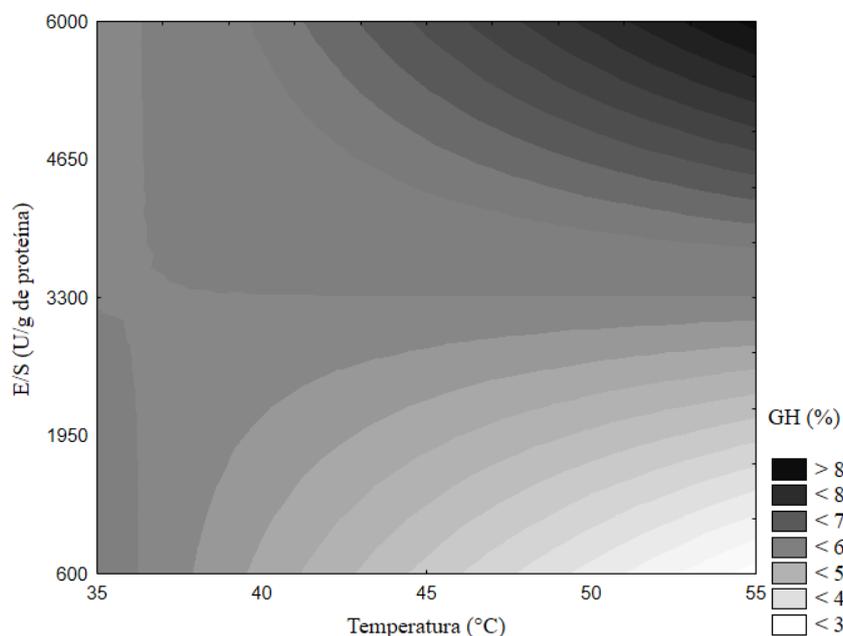
do sal, acarretando na exposição de grupamentos que até então estavam ocultos e inativos no interior da molécula (JANATI-FARD et al., 2018).

Figura 4 - Curva de contorno para o grau de hidrólise em função da razão E/S e da concentração de cálcio no extrato enzimático.



A Figura 5 mostra que o aumento da razão enzima/substrato para 6000 U/g de proteína e aumento da temperatura para 55 °C estabelecem valores de GH elevados quando comparados com as outras condições. Chen et al. (2017) também observaram o aumento do GH com maiores quantidades de enzima, verificando que o GH para o resíduo de molho de soja aumentou com o aumento da quantidade de enzima de 3000 U/g para 6000 U/g e depois se manteve constante de 6000 a 7000 U/g para as enzimas alcalase, papaína e mistura de neutrase/papaína (1:3). As condições ideais para se obter o maior GH foram de 6000 U/g, pH 7,8, temperatura de 50 °C, já que o aumento da temperatura causou uma alteração na estrutura conformacional da enzima, levando-a à desnaturação térmica, e concentração de 5% de substrato, atingindo um GH de 15,5% nos ensaios de validação. No presente trabalho o maior GH foi obtido quando se utilizou concentração de 50 mmol/L de CaCl₂ no extrato enzimático, 55 °C, razão E/S de 6000 U/g e concentração proteica de substrato de 10 g/L.

Figura 5 - Curva de contorno para o grau de hidrólise em função da razão E/S e da temperatura.



5.3.2 Recuperação de proteínas

Na Tabela 8 estão apresentados os valores das variáveis estudadas e as interações entre elas para a RP. Apenas as variáveis temperatura (L) e razão enzima/substrato (L) foram significativas para a RP. As outras variáveis não significativas foram adicionadas ao resíduo para o cálculo da análise de variância (ANOVA), conforme Tabela 9.

O coeficiente de correlação (R) e a análise de variância (ANOVA) foram utilizados para verificar a adequação estatística do modelo proposto codificado aos valores experimentais. Os valores preditivos foram calculados a partir de Equação 11. Na Tabela 9 é possível observar que o modelo gerado é preditivo, apesar dos desvios altos nos pontos axiais, apresentados na Tabela 5. Nos pontos centrais (ensaios 25 a 28) foram observados desvios menores que 13%, observando-se que nestes pontos o modelo descreve bem os ensaios experimentais. O $F_{\text{calculado}}$ foi cerca de 7 vezes maior que o F_{tabelado} . O coeficiente de correlação (R) para o modelo ajustado para o grau de hidrólise foi de 0,808, sendo que este valor indica que o modelo obtido explica aproximadamente 80,8% da variação dos dados observados da recuperação de proteína. Os desvios relativos para a RP, apresentados na Tabela 5, variaram de 0,5% (condição 2) a 49,4% (condição 20).

Tabela 8 - Coeficiente de regressão, erro padrão e nível de significância (p) para a recuperação de proteínas.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t (13)	p-valor
Média*	23,33	2,11	11,06	<0,01
X ₁ (L)	0,13	1,72	-0,15	0,88
X ₁ (Q)	-0,20	1,72	-0,23	0,82
X ₂ (L)*	4,16	1,72	4,83	<0,01
X ₂ (Q)	-0,67	1,72	-0,78	0,45
X ₃ (L)*	3,41	1,72	3,96	<0,01
X ₃ (Q)	0,03	1,72	0,03	0,97
X ₄ (L)	-1,38	1,72	-1,61	0,13
X ₄ (Q)	0,87	1,72	1,01	0,33
X ₁ X ₂	1,16	2,11	1,10	0,29
X ₁ X ₃	0,44	2,11	0,41	0,68
X ₁ X ₄	0,44	2,11	0,41	0,68
X ₂ X ₃	-0,05	2,11	-0,05	0,96
X ₂ X ₄	-0,70	2,11	-0,66	0,52
X ₃ X ₄	-0,98	2,11	-0,92	0,37

* Efeito significativo ($p < 0,1$); X₁:CaCl₂ (mmol/L); X₂: Temperatura (°C); X₃: razão E/S (U/g de proteína); X₄: Concentração de proteína do substrato (g/L).

Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) do DCCR 2⁴ para a recuperação de proteínas.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	R
Regressão	693,80	2	346,90	23,56	0,808
Resíduo	368,07	25	14,72		
Total	1061,87	27			

F_{0,1;2,25;3,39}

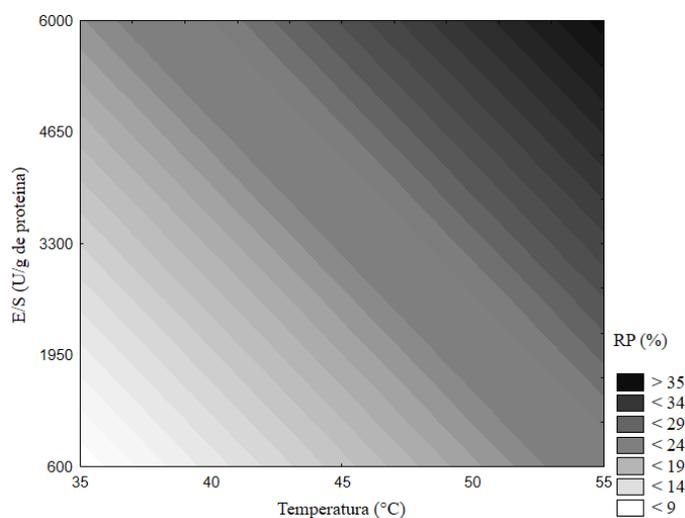
A partir da análise dos coeficientes de regressão foi possível gerar a equação do modelo com as variáveis codificadas que representam o comportamento da RP. Onde X₂: temperatura (°C) e X₃: razão enzima/substrato (U/g de proteína).

$$RP(\%) = 23,35 + 4,16X_2 + 3,41X_3 \quad (11)$$

A curva de contorno da RP em função da razão E/S e da temperatura (Figura 6) indica que valores mais elevados de razão enzima/substrato de 600 para 6000 U/g de proteína e elevação de temperatura de 35 °C para 55 °C, resultam em maiores valores de RP (>35%). Entretanto, temperaturas elevadas acarretam a desnaturação da enzima, com perda da sua atividade, ocorrendo estabilização da reação enzimática em baixos valores de grau de hidrólise. Essa diminuição de hidrólise em temperaturas próximas a 55°C também ocorreu para a hidrólise de resíduos viscerais da carpa de água doce (*Catla catla*) usando Alcalase comercial, que resultou em um grau de hidrólise de cerca de 50% em condições otimizadas de temperatura 50 °C, tempo de reação de 135 min, pH 8,5 e concentração enzimática de 1,5% (BHASKAR et al., 2008).

A influência das variáveis de processo sobre a recuperação de proteína, quando se utiliza o planejamento experimental, depende das faixas de variáveis estudadas, uma vez que dentro da faixa de atividade ótima da enzima a reação será favorecida. Na Figura 6 foi observado um efeito positivo da razão E/S na RP, mostrando que o aumento da concentração enzimática e da temperatura resulta em um hidrolisado com maior GH (> 8%) e RP (>35%). Ovişşipour et al. (2009) citam que um maior grau de hidrólise resultará em maior solubilização de peptídeos e, conseqüentemente, maiores valores de recuperação de proteínas. O aumento da razão E/S leva ao aumento dos sítios ativos disponíveis para o substrato ser hidrolisado. Com isso ocorre maior clivagem das ligações peptídicas presentes no substrato e, conseqüentemente, elevação do grau de hidrólise e maior recuperação das proteínas no hidrolisado.

Figura 6 - Curva de contorno para a recuperação de proteínas em função da razão E/S e da temperatura.



Chen et al. (2017) observaram que quando a hidrólise de resíduo de molho de soja ocorreu com concentração enzimática de 6000 U/g, temperatura de 50 °C e concentração de substrato 4%, o valor de RP para o resíduo do molho de soja chegou a 60,0% em 240 min de reação e GH de 15,5%. Em 20 min de reação, a RP foi de 57,2% e GH 10,4%. Os resultados de Chen et al. (2017) corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho, onde maiores valores de GH (>8%) levaram a maiores valores de RP (>35%). Como RP é um índice de dissolução de proteínas, se a taxa de reação da hidrólise aumentar a dissolução de proteínas também aumentará (SILVA; PARK; HUBINGER, 2010).

Cheong et al. (2018) investigaram a viabilidade da hidrólise enzimática para solubilização de penas e produção de proteínas, usando uma protease comercial, Savinase Ultra 16L. As condições de hidrólise sem pré-tratamento aplicado foram concentração de substrato de 4%, temperatura de 55 °C e concentração enzimática 2,6% (v/v), onde a recuperação de proteína foi de 5%. A recuperação de proteínas da farinha de penas pela reação enzimática pela protease de *Bacillus* sp. P45 do presente trabalho foi cerca de 8 vezes maior quando comparada ao estudo de Cheong et al. (2018). Uma das possíveis razões para o valor mais alto pode ser a utilização de uma protease bruta que pode conter enzimas que atuam nas ligações dissulfeto das queratinas.

Assim, a partir da análise dos resultados do planejamento experimental, é possível perceber que o aumento da temperatura para 55 °C e a razão enzima/substrato de 6000 U/g de proteína podem favorecer o aumento dos valores de GH e RP para 10,2% e 38,4% a partir do cálculo dos valores preditivos, enquanto que as outras variáveis, apesar de não serem significativas para a RP, são significativas para o GH, onde uma diminuição da concentração proteica de substrato para 10 g/L e um aumento até certo ponto da concentração de CaCl₂ (50 mmol/L) resultaram no aumento do GH.

5.3.3 Validação do DCCR 2⁴

Três condições diferentes de hidrólise foram escolhidas para validar o modelo (Tabela 10). A condição 1 foi escolhida com base nos valores das curvas de contorno, onde os maiores valores de GH e RP seriam obtidos com razão enzima/substrato de 6000 U/g de proteína, concentração de CaCl₂ de 50 mmol/L, concentração proteica de substrato 10 g/L e temperatura de 55 °C. A condição 2 apresenta diferença no valor de temperatura, sendo esta realizada a 50 °C, pois como pode ser visualizado na Tabela 5, a temperatura de 55 °C foi a que apresentou maior desvio relativo tanto para o GH (-33,5%) quanto para a RP (-49,4%). A

condição 3, com temperatura de 50 °C, razão enzima/substrato de 4650 U/g de proteína, concentração de CaCl₂ de 75 mmol/L e concentração proteica de substrato 17,5 g/L foi escolhida devido ao fato de apresentar os melhores resultados no planejamento, obtendo um GH de 8,3% e uma RP de 38,1%, com os desvios relativos de 13% e 18,9%, respectivamente.

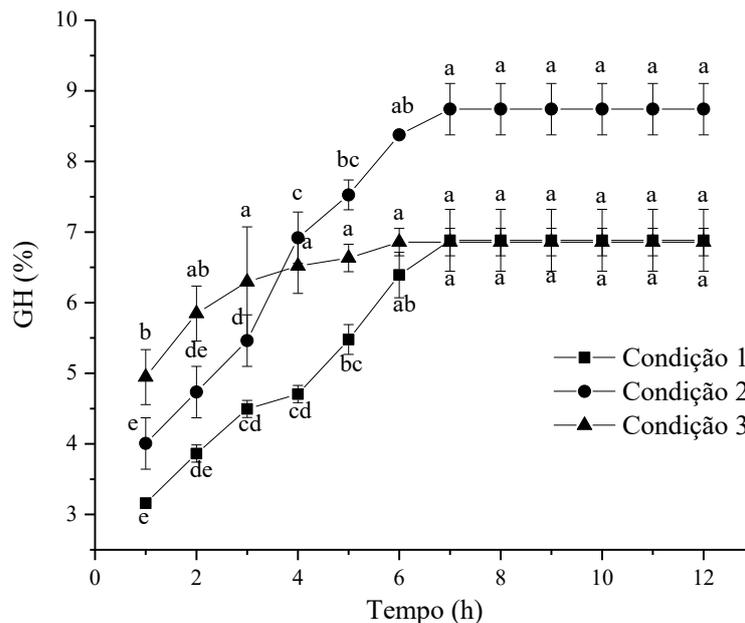
Tabela 10 - Valores codificados e reais (entre parênteses) das variáveis independentes para os ensaios de validação da hidrólise da farinha de penas.

Ensaios de validação	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
Condição 1	0 (50)	2 (55)	2 (6000)	-2 (10,0)
Condição 2	0 (50)	1 (50)	2 (6000)	-2 (10,0)
Condição 3	1 (75)	1 (50)	1 (4650)	-1 (17,5)

X₁:CaCl₂ (mmol/L); X₂: Temperatura (°C); X₃: razão E/S (U/g de proteína); X₄: Concentração de proteína do substrato (g/L)

O acompanhamento da cinética da hidrólise enzimática para o grau de hidrólise (Figura 7) e para a recuperação de proteínas (Figura 8) foi realizado durante 12 h de reação. Na Figura 7 é possível observar que o GH para os ensaios de validação foi maior na condição 2 (8,7%), seguido pelas condições 1 e 3, que apresentaram o mesmo valor de GH (6,9%).

Figura 7 - Grau de hidrólise para os ensaios de validação ao longo de 12 h de reação.



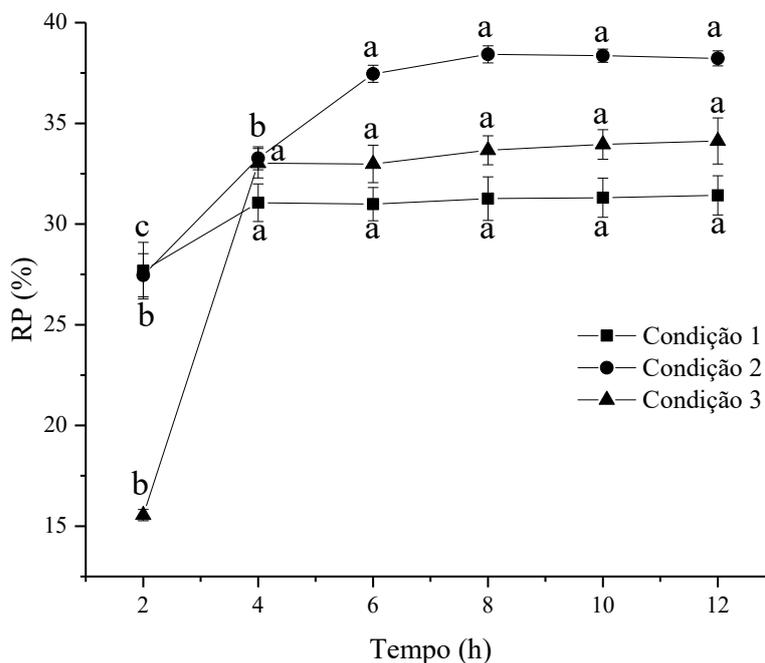
Letras iguais no mesmo ensaio indicam que não há diferença significativa entre as médias. (Teste de Tukey, $p > 0,05$ e $n=3$).

Na Figura 7 observa-se que as curvas apresentam uma maior elevação no GH nas primeiras 5 h de reação, onde um grande número de ligações é clivado, até alcançar uma fase estacionária (a partir de 7 h). Processos de hidrólise são definidos inicialmente por elevadas taxas de reação, pois neste período há uma menor concentração de proteínas solúveis em competição com substrato e maior disponibilidade de sítio ativos, havendo então maior clivagem de ligações peptídicas. A etapa seguinte é caracterizada pela diminuição dessa taxa, já que esta etapa pode estar relacionada à desnaturação da enzima ou associada à presença de produto de inibição por compostos formados durante a hidrólise e à ação de peptídeos solúveis, que atuam como um concorrente do substrato para as proteínas não hidrolisadas (ADLER-NISSEN, 1986; SILVA; PARK; HUBINGER, 2010). Esse mesmo padrão de curva foi obtido em estudos de hidrólise de espinha dorsal de *Rastrelliger kanagurta* (SHERIFF et al., 2014), proteína de soja (SUPPAVORASATIT; MEJIA; CADWALLADER, 2011) e glúten de trigo (KONG; ZHOU; QIAN, 2007).

A Figura 8 apresenta a recuperação da proteína para as diferentes condições ao longo das 12 h de reação. É possível observar que a recuperação de proteínas estabiliza após 4 h de hidrólise para as condições 1 (31,1%) e 3 (33,0%); enquanto que para a condição 2 a recuperação de proteínas estabiliza após 6 h de hidrólise. Além disso, a condição 2, quando comparada com as demais, apresentou maiores valores de RP, sendo este de 38,4% (12 h de reação).

Assim como o GH tem sido utilizado como um indicador da clivagem da ligação peptídica, a RP aponta o rendimento de proteínas que podem ser recuperadas do processo de hidrólise. Nas Figuras 7 e 8 é possível comparar o comportamento da condição 1 em relação à condição 2, onde todos os parâmetros são os mesmos exceto a temperatura (55 °C para a condição 1 e 50 °C para a condição 2). Ambas respostas, GH e RP, foram menores quando a temperatura foi maior (55 °C), em decorrência de desnaturação térmica da enzima (ZHENG et al., 2013). O GH mede a extensão da degradação de proteínas, já que quanto maior o GH, maior o número de peptídeos produzido na solução. O aumento da produção de peptídeos durante a reação resulta no aumento da solubilidade da proteína e aumenta a possibilidade de recuperação de proteínas solúveis (SHERIFF et al., 2014).

Figura 8 - Recuperação de proteínas para os ensaios de validação ao longo de 12 h de reação.



Letras iguais no mesmo ensaio indicam que não há diferença significativa entre as médias. (Teste de Tukey, $p > 0,05$ e $n=3$).

Resultados aproximados de recuperação de proteínas foram encontrados por Callegaro, Welter e Daroit (2018), que realizaram um estudo em que a hidrólise microbiana das penas foi baseada no crescimento microbiano e na secreção de proteases que atuaram no substrato proteico, no cultivo. Três cepas queratinolíticas de *Bacillus* foram inicialmente avaliadas para hidrolisado de penas, com concentração de 10 g/L, através de cultivo submerso em diferentes períodos de cultivo para cada cepa bacteriana, considerando seus respectivos potenciais de degradação de penas. O teor de proteínas solúveis para *Bacillus* sp. CL18 foi de 3,68 mg/mL em 7 d de cultivo, para *Bacillus* sp. CL33A foi 0,63 mg/mL em 9 d de cultivo e para *Bacillus* sp. CL14 foi de 3,51 mg/mL em 13 d de cultivo. Estes valores correspondentes a aproximadamente 36,8%, 6,3% e 35,1% de recuperação de proteína, respectivamente.

A Tabela 11 apresenta os resultados experimentais e preditos conforme o modelo (Equações 10 e 11), bem como o desvio relativo para ambas respostas, GH e RP. Os desvios relativos das condições 2 e 3 foram inferiores a 10,6% demonstrando assim que o modelo é preditivo. No entanto, para a condição 1, onde se tem uma temperatura mais elevada (55 °C), os desvios relativos foram elevados, atingindo valores de -48,1% e -22,9% para GH e RP, respectivamente (Tabela 11). Assim, em temperaturas elevadas o modelo não consegue prever o que acontece no processo de hidrólise enzimática devido a desnaturação térmica da enzima, que afeta sua atividade biológica (ZHENG et al., 2013).

Sendo assim, por apresentar os maiores valores de GH (8,7%) e RP (38,4%) e desvios relativamente baixos (-8,7% para GH e 10,6% para RP), a condição 2, com os parâmetros de concentração de CaCl₂ de 50 mmol/L, temperatura de 50 °C, razão E/S de 6000 U/g e concentração proteica de substrato de 10 g/L no tempo de reação de 6 h, que é estatisticamente igual ao nível de 95% de confiança às demais horas, foi escolhida para posterior separação em diferentes frações e análise das atividades antioxidantes.

Tabela 11 - Valores experimentais, preditos e desvio relativo para grau de hidrólise e recuperação de proteínas nos ensaios de validação em 8 h de reação.

Ensaio	GH (%)			RP (%)		
	Experimental	Predito	Desvio Relativo (%)	Experimental	Predito	Desvio Relativo (%)
Condição 1	6,9	10,2	-48,1	31,3	38,4	-22,9
Condição 2	8,7	9,5	-8,7	38,4	34,3	10,6
Condição 3	6,9	7,2	-4,6	33,7	30,9	8,3

Comparando os valores de RP e GH obtidos pela condição 2 (tempo 6 h) dos ensaios de validação com aqueles obtidos nos ensaios iniciais realizados em reator com ajuste de pH (tempo 8 h), foi possível aumentar o GH 2,48 vezes e a RP em 2,37 vezes.

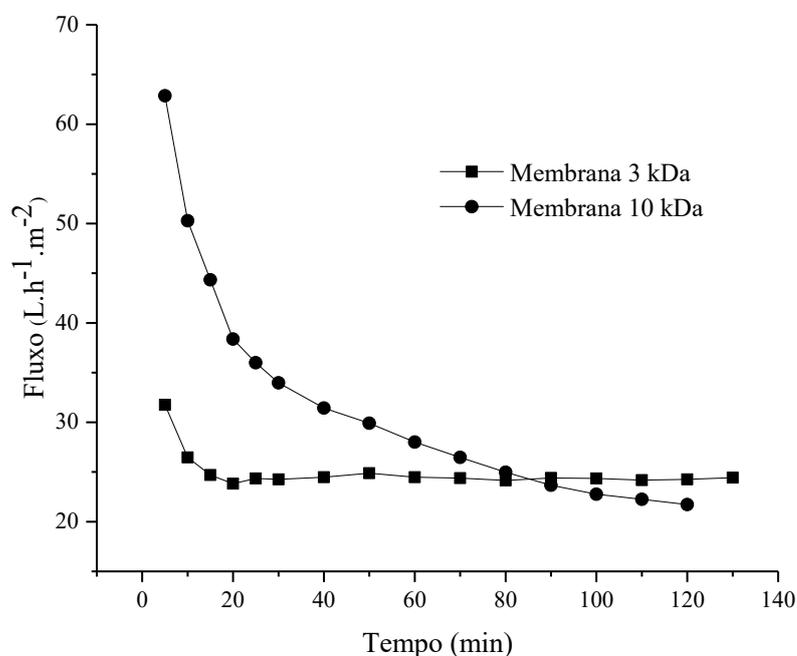
5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS HIDROLISADOS

Por apresentar os maiores valores de GH (8,7%) e RP (38,4%), a condição 2 do ensaio de validação, com razão enzima/substrato de 6000 U/g de proteína, concentração de CaCl₂ de 50 mmol/L, concentração proteica de substrato 10 g/L e temperatura de 50 °C foi selecionada para produção e separação em membranas com massa molar de corte de 10 kDa e 3 kDa. Após a ultrafiltração as frações foram liofilizadas para posterior análise da atividade antioxidante, a fração >10 kDa representou a maior porção do material liofilizado (40%), as frações 3-10 kDa e <3 kDa representaram cada, 30% do hidrolisado liofilizado.

A Figura 9 apresenta os fluxos de permeado dos ensaios. Pode-se observar que a membrana de 10 kDa apresenta fluxo inicial superior (62,8 L/hm²) quando comparada com a membrana de 3 kDa (31,7 L/hm²), que alcança fluxo constante nos primeiros minutos, uma vez que o hidrolisado permeou mais facilmente pela membrana, devido ao tamanho dos poros. Ao

término da ultrafiltração a membrana de 10 kDa apresentou fluxo de 21,7 L/hm² e a de 3 kDa 24,4 L/hm².

Figura 9 - Fluxo de permeado nos ensaios de ultrafiltração.



A ultrafiltração é uma técnica de separação simples e de fácil aumento de escala, que utiliza baixas pressões e temperaturas, minimizando a desnaturação dos hidrolisados (BRANDELLI; SALA; KALIL, 2015). O grau de hidrólise afeta o tamanho e a composição de aminoácidos dos peptídeos, o que poderia modular a atividade biológica dos peptídeos formados durante a hidrólise (CHEN et al., 2012). A determinação da atividade antioxidante é de grande importância, visto que nas últimas décadas, os antioxidantes ganharam crescente interesse devido aos seus efeitos benéficos contra várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo, incluindo diabetes mellitus, inflamação crônica, neurodegeneração, distúrbios gerativos e certos tipos de câncer (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009).

Como o desempenho dos antioxidantes geralmente varia dependendo da natureza dos compostos presentes na amostra, foram utilizadas dois métodos para a determinação da atividade antioxidante das frações do hidrolisado, sendo eles os métodos ABTS e ORAC. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 12. De acordo com os resultados foi possível verificar que o hidrolisado não ultrafiltrado e suas frações foram capazes de sequestrar os radicais ABTS^{•+} e peroxila (ORAC). As diferenças nas capacidades antioxidantes encontradas

nos dois métodos podem ser explicadas pela natureza diferente dos dois ensaios (GÓMEZ-SAMPEDRO; ZAPATA-MONTOYA, 2016).

Tabela 12 - Atividade antioxidante utilizando o método ABTS^{•+} (μmol TE/g) e ORAC (μmol TE/g) das amostras não hidrolisada, não ultrafiltrada e das suas frações.

Amostra	ABTS ^{•+} (μmol TE/g)	ORAC (μmol TE/g)
Não hidrolisado	31,93 ± 6,40 ^c	153,48 ± 0,60 ^c
Não ultrafiltrado	46,84 ± 4,86 ^{b, c}	808,13 ± 36,98 ^b
>10 kDa	37,13 ± 7,95 ^c	176,61 ± 11,04 ^c
3-10 kDa	61,85 ± 5,97 ^b	257,23 ± 38,93 ^c
<3 kDa	90,20 ± 3,25 ^a	1892,47 ± 95,62 ^a

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença estatística entre as médias. (Teste de *Tukey*, $p > 0,05$ e $n=3$).

A diferença entre os valores das amostras na capacidade em sequestrar o radical peroxila (ORAC) do que o radical livre ABTS^{•+} pode ser explicada devido aos mecanismos distintos dos métodos utilizados: o ORAC é baseado na transferência de átomos de hidrogênio, enquanto que o ABTS, na transferência de elétrons (SARMADI; ISMAIL, 2010).

A farinha de penas não hidrolisada, devido à estrutura compacta da proteína, apresenta uma atividade antioxidante mínima de 31,93 μmol TE/g para o método ABTS e 153,48 μmol TE/g para o método ORAC. A ruptura da estrutura da proteína nativa por hidrólise enzimática resultou na abertura e exposição de resíduos de aminoácidos ativos capazes de reagir com os oxidantes (KONG; ZHOU; QIAN, 2007). Foi observado que a amostra <3 kDa apresentou um aumento na atividade antioxidante de 92,5% para o método ABTS e 134,2% para o método ORAC em relação ao hidrolisado não ultrafiltrado. Os resultados são consistentes com a maior capacidade dos peptídeos de baixa massa molar de interagir e eliminar os radicais livres quando comparados aos peptídeos maior massa molar (ZHANG; MU, 2017).

A comparação dos resultados de atividade antioxidante com a literatura é difícil uma vez que poucos trabalhos utilizam a metodologia de ORAC e ABTS para avaliação da capacidade antioxidante de hidrolisados proteicos e a maioria existente apresenta resultados com unidades diferentes das utilizadas no presente estudo.

O hidrolisado de isolado de proteína de quinoa com a enzima papaína apresentou uma atividade antioxidante de 501,6 μmol TE/g pelo método ORAC (NONGONIERMA et al., 2015). O valor obtido através da hidrólise de peixe gato foi de 51,4 μmol TE/g para o método

ORAC e 174,6 $\mu\text{mol TE/g}$ para o método ABTS (GUO et al., 2019). Gómez-Sampedro e Zapata-Montoya (2016) fracionaram (<3 kDa, 3-10 kDa e >10 kDa) os peptídeos obtidos no hidrolisado de plasma bovino na reação enzimática catalisada pela enzima Alcalase em 2 h de reação com grau de hidrólise de 19,1% e observaram uma atividade antioxidante pelo método ORAC maior na fração <3 kDa (852 $\mu\text{molTE/g}$). Assim como no presente trabalho, a fração >10 kDa foi a que apresentou a menor atividade antioxidante, no valor de 233,7 $\mu\text{molTE/g}$. Resultados semelhantes foram apresentados no estudo realizado para o hidrolisado de batata doce por Alcalase sob alta pressão hidrostática, onde a atividade antioxidante foi maior nas frações <3 kDa (ZHANG; MU, 2017).

Olagunju et al. (2018) verificaram que as menores frações de hidrolisado de ervilha apresentaram as maiores atividades antioxidantes frente ao radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, obtendo um valor de 2,253 $\mu\text{molTE/g}$ na fração <1 kDa e observaram que a atividade antioxidantes diminuiu conforme o aumento da massa molar dos hidrolisados. Nhooh e Gan (2016) também observaram que a fração peptídica <3 kDa de feijão apresentou a maior atividade antioxidante pelo métodos ABTS, quando comparada com peptídeos de massas molares maiores. Guo et al. (2015) separaram por ultrafiltração em membranas de 3 kDa, 5 kDa e 10 kDa, os hidrolisados de cereja chinesa catalisadas pelas enzimas Neutrase e Alcalase e as atividades antioxidantes frente ao radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foram maiores nas frações 3-5 kDa e <3 kDa.

A ação da protease de *Bacillus* sp. P45 sobre a farinha de penas foi capaz de gerar hidrolisados com propriedades antioxidantes. Os hidrolisados na fração de <3 kDa tiveram aumentos significativos nas atividades antioxidantes pelos métodos ABTS e ORAC, quando comparada com a amostra sem hidrólise.

6 CONCLUSÃO

A reação de hidrólise de farinha de penas com a protease de *Bacillus* sp. P45 em reator encamisado com ajuste de pH apresentou maiores valores de GH (3,3%) e de RP (16,2%) quando comparada com a reação em incubadora rotatória, com e sem ajuste de pH.

Nos ensaios realizados para a maximização, foi possível observar que a protease de *Bacillus* sp. P45 pode ser empregada na hidrólise da farinha de penas, sendo capaz de hidrolisar a mesma em todas as condições testadas. Os maiores valores obtidos para o GH e a RP foram 8,7% e 38,4% nas condições de 50 mmol/L de CaCl₂, 50 °C, 6000 U/g de proteína e concentração proteica de substrato de 10 g/L no tempo de 8 h. Esta condição em 6 h de reação apresentou valor de GH de 8,4% e RP de 37,5%.

O hidrolisado foi separado por ultrafiltração em três frações diferentes (10 e 3 kDa) e foi avaliada a sua capacidade antioxidante pelos métodos de capacidade de sequestro do radical ABTS^{•+} e capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC). Os resultados mostraram que peptídeos de menor massa molar (<3 kDa) apresentaram atividade antioxidante de 90,20 µmolTE/g frente ao radical ABTS^{•+} e 1892,47 µmolTE/g pelo método ORAC. Estes resultados representam incrementos de 92,5% para o método ABTS e 134,2% para o método ORAC em relação ao hidrolisado não ultrafiltrado. Tais resultados são promissores quanto à capacidade da protease de *Bacillus* sp. P45 de promover a hidrólise da farinha de penas, além de gerar peptídeos com atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório anual 2018**. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-aneais/2018>>. Acesso em: 6 maio. 2019.
- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. Nova Iorque: Elsevier Applied science publishers, 1986.
- AHMED, Z.; DONKOR, O.; STREET, W.; VASILJEVIC, T. Proteolytic activities in fillets of selected underutilized Australian fish species. **Food Chemistry**, v. 140, p. 238–244, 2013.
- BACH, E.; SANT’ANNA, V.; DAROIT, D.; CORRÊA, A.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Production, one-step purification, and characterization of a keratinolytic protease from *Serratia marcescens* P3. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2455–2462, 2012.
- BAH, C. S. F.; BEKHIT, A. E. D. A.; MCCONNELL, M. A.; CARNE, A. Generation of bioactive peptide hydrolysates from cattle plasma using plant and fungal proteases. **Food Chemistry**, v. 213, p. 98–107, 2016.
- BAH, C. S. F.; BEKHIT, A. E. D. A.; CARNE, A.; MCCONNELL, M. A. Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep and pig plasma using plant and fungal protease preparations. **Food Chemistry**, v. 176, p. 54–63, 2015.
- BAI, R.; LEOW, H. F. Microfiltration of activated sludge wastewater - the effect of system operation parameters. **Separation and Purification Technology**, v. 29, p. 189–198, 2002.
- BAIANO, A. Recovery of biomolecules from food wastes - A review. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14821–14842, 2014.
- BBC RESEARCH. **Global markets for enzymes in industrial applications**. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html>>. Acesso em: 22 jan. 2020.
- BELMESSIKH, A.; BOUKHALFA, H.; MECHAKRA-MAZA, A.; GHERIBI-AOULMI, Z.; AMRANE, A. Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, n. 3, p. 377–385, 2013.

BERTSCH, A.; COELLO, N. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 15, p. 1703–1708, 2005.

BHASKAR, N.; BENILA, T.; RADHA, C.; LALITHA, R. G. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2, p. 335–343, 2008.

BOCKE, B.; GALUNSKY, B.; MULLER, R. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3705–3710, 1995.

BORBA, T. M. **Estabilidade e aplicação de protease de P45 na hidrólise proteica de plasma de sangue bovino**. 2019. 156f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS.

BRAGA, A. R. C.; MESQUITA, L. M. DE S.; MARTINS, P. L. G.; HABU, S.; DE ROSSO, V. V. *Lactobacillus* fermentation of jussara pulp leads to the enzymatic conversion of anthocyanins increasing antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 69, n. December 2017, p. 162–170, 2018.

BRANCO, A. F.; CONEGLIAN, S. M.; MOURO, G. F.; TADEU, G.; ZEOULA, L. M.; BUMBIERIS, V. H. Farinha de penas hidrolisada em dietas de ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1454–1460, 2003.

BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: Useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 2, p. 105–116, 2008.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1735–1750, 2010.

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

BROWNSTONE, S. **Green chemists use rocket science and chicken feathers to create cow-less leather**. Disponível em: <<https://www.fastcompany.com/3023593/green-chemists-use-rocket-science-and-chicken-feathers-to-create-cow-less-leather>>. Acesso em: 11 ago.

2019.

BRUSH, A. H. On the origin of feathers. **Evolutionary Biology**, v. 9, p. 131–142, 1996.

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

CAMPOS, I.; MATOS, E.; MARQUES, A.; VALENTE, L. M. P. Hydrolyzed feather meal as a partial fishmeal replacement in diets for *European seabass (Dicentrarchus labrax)* juveniles. **Aquaculture**, v. 476, p. 152–159, 2017.

CAO, Z. J.; ZHANG, Q.; WEI, D. K.; CHEN, L.; WANG, J.; ZHANG, X. Q.; ZHOU, M. H. Characterization of a novel *Stenotrophomonas* isolate with high keratinase activity and purification of the enzyme. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 181–188, 2009.

CAPANOGLU, E.; KAMILOGLU, S.; OZKAN, G.; APAK, R. Evaluation of antioxidant activity/capacity measurement methods for food products. **Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications**, v. 13, p. 273–286, 2017.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. A response surface approach on optimization of hydrolysis parameters for the production of egg white protein hydrolysates with antioxidant activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 55–62, 2015.

CAVALLI, S. V.; SILVA, S. V.; CIMINO, C.; MALCATA, F. X.; PRIOLO, N. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. **Food Chemistry**, v. 106, p. 997–1003, 2008.

CENTENARO, G. S.; SALAS-MELLADO, M.; PIRES, C.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; PRENTICE, C. Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: Investigation of antioxidant activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 2877–2893, 2014.

CHEN, C.; CHI, Y. J.; ZHAO, M. Y.; XU, W. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 27–34, 2012.

CHEN, X.; LUO, Y.; QI, B.; LUO, J.; WAN, Y. Improving the hydrolysis efficiency of soy

sauce residue using ultrasonic probe-assisted enzymolysis technology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 35, p. 351–358, 2017.

CHENG, S.; WANG, Y.; WANG, M. Statistical optimization of medium compositions for alkaline protease production by newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens*. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 26, p. 225- 231., 2012.

CHEONG, C. W.; LEE, Y. S.; AHMAD, S. A.; OOI, P. T.; PHANG, L. Y. Chicken feather valorization by thermal alkaline pretreatment followed by enzymatic hydrolysis for protein-rich hydrolysate production. **Waste Management**, v. 79, p. 658–666, 2018.

CHI, Z.; MA, C.; WANG, P.; LI, H. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 534–538, 2007.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 254–262, 2000.

CONTESINI, F. J.; MELO, R. R.; SATO, H. H. An overview of *Bacillus* proteases: From production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 321–334, 2017.

CONTRERAS, M. M.; SEVILLA, M. A.; MONROY-RUIZ, J.; AMIGO, L.; GÓMEZ-SALA, B.; MOLINA, E.; RAMOS, M.; RECIO, I. Food-grade production of an antihypertensive casein hydrolysate and resistance of active peptides to drying and storage. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 7, p. 470–476, 2011.

CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; COELHO, J.; MEIRA, S. M.; LOPES, F. C.; SEGALIN, J.; RISSO, P. H.; BRANDELLI, A. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 12, p. 2247–2254, 2011.

CUI, Z. Protein separation using ultrafiltration — an example of multi-scale complex systems. **China Particuology**, v. 3, n. 6, p. 343–348, 2005.

DAROIT, D. J.; CORRA, A. P. F.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 28, n. 5–6, p. 370–379, 2010.

DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. A current assessment on the production of bacterial keratinases. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 85, p. 1–13, 2013.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 358–363, 2009.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 45–51, 2011.

DARRAGH, A. J.; MOUGHAN, P. J. The effect of hydrolysis time on amino acid analysis. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 3, p. 888–893, 2005.

DIAZ-PEREZ, J. C.; KEITH JENKINS, W. Detrimental effects of blood meal and feather meal on tomato (*Solanum lycopersicon* L.) seed germination. **HortScience**, v. 52, n. 1, p. 138–141, 2017.

DIECKMANN, E.; ELEFThERIOU, K.; AUDIC, T.; LEE, K. Y.; SHELDRIK, L.; CHEESEMAN, C. New sustainable materials from waste feathers: Properties of hot-pressed feather/cotton/bi-component fibre boards. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 20, 2019.

DIETERICH, F.; BOSCOLO, W.; BERTOLDO, M. T. P.; SILVA, V. S. N.; GONÇALVES, G. S.; VIDOTTI, R. M. Development and characterization of protein hydrolysates originated from animal agro industrial byproducts. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, v. 1, n. 2, p. 56–61, 2014.

DINIZ, F. M.; MARTIN, A. M. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 31, n. 5, p. 419–426, 1996.

DIVAKALA, K. C.; CHIBA, L. I.; KAMALAKAR, R. B.; RODNING, S. P.; WELLES, E. G.; CUMMINS, K. A.; SWANN, J.; CESPEDES, F.; PAYNE, R. L. Amino acid supplementation of hydrolyzed feather meal diets for finisher pigs. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 4, p. 1270–1281, 2009.

EIJSINK, V. G. H.; MATTHEWS, B. W.; VRIEND, G. The role of calcium ions in the stability and instability of a thermolysin-like protease. **Protein Science**, v. 20, n. 8, p. 1346–1355, 2011.

FAKHFAKH, N.; KANOUN, S.; MANNI, L.; NASRI, M. Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPK. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 427–436, 2009.

FAKHFAKH, N.; KTARI, N.; HADDAR, A.; MNIF, I. H.; DAHMEN, I.; NASRI, M. Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 9, p. 1731–1737, 2011.

FAO - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. **Perspectivas agrícolas 2015 - 2024**. Disponível em: <www.fao.org/americas/noticias/ver/pt/c/1143495/>. Acesso em: 25 nov. 2019.

GESSESSE, A.; HATTI-KAUL, R.; GASHE, B. A.; MATTIASSON, B. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 519–524, 2003.

GÓMEZ-SAMPEDRO, L. J.; ZAPATA-MONTOYA, J. E. Obtaining of antioxidant peptide from bovine plasma hydrolysates and effect of the degree of hydrolysis on antioxidant capacity. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 15, n. 1, p. 101–109, 2016.

GONÇALVES, S. M. **Hidrólise de caseína e plasma de sangue bovino com protease de *Bacillus* sp. P45**. 2016. 94f. (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.

GORDON, R. E.; HAYNES, W. C.; PANG, C. H. N.; SMITH, N. R. The genus *Bacillus*. In: **Practical handbook of microbiology**. New York: CRC Press, 1973. p. 109–126.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, n. 3–4, p. 111–120, 2006.

GRADISAR, H.; KERN, S.; FRIEDRICH, J. Keratinase of *Doratomyces microsporius*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 196–200, 2000.

GRAEFF, A.; MONDARDO, M. Substituição da farinha de peixes pela farinha de penas hidrolizada na alimentação da carpa comum (*Cyprinus carpio* L). **Revista Ceres**, v. 53, n. 305, p. 7–13, 2006.

GULMEZ, C.; ATAKISI, O.; DALGINLI, K. Y.; ATAKISI, E. Organic solvent stable and thermo-alkaline recombinant subtilisin as a novel biocatalytic detergent additive. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 436–443, 2018.

GUO, P.; QI, Y.; ZHU, C.; WANG, Q. Purification and identification of antioxidant peptides from Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus* Lindl.) seeds. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 394–403, 2015.

GUO, Y.; MICHAEL, N.; MADRIGAL, J. F.; AGUIRRE, C. S.; JAUREGI, P. Protein hydrolysate from pterygoplichthys disjunctivus, armoured catfish, with high antioxidant activity. **Molecules**, v. 24, p. 2–18, 2019.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; KHAN, S.; CHAUHAN, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 4, p. 381–395, 2002.

GUPTA, R.; RAJPUT, R.; SHARMA, R.; GUPTA, N. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 23, p. 9931–9940, 2013.

GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: An overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 1, p. 21–33, 2006.

HE, X. Q.; CAO, H.; PAN, K.; HUA, C. Enzymatic hydrolysis optimization of *Paphia undulata* and lymphocyte proliferation activity of the isolated peptide fractions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 1544–1533, 2015.

HELAL, M.; AMER, H.; ABDELWAHED, N.; GHOBASHY, M. Physiological and microbiological studies on production of alkaline protease from locally isolated *Bacillus subtilis*. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 6, p. 193–203, 2012.

- HERREGODS, G.; VAN CAMP, J.; MOREL, N.; GHESQUIÈRE, B.; GEVAERT, K.; VERCRUYSSSE, L.; DIERCKX, S.; QUANTEN, E.; SMAGGHE, G. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of gelatin hydrolysates and identification of bioactive peptides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 552–558, 2011.
- HIDALGO, M. E.; DAROIT, D. J.; FOLMER CORRÊA, A. P.; PIENIZ, S.; BRANDELLI, A.; RISSO, P. H. Physicochemical and antioxidant properties of bovine caseinate hydrolysates obtained through microbial protease treatment. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 3, p. 342–352, 2012.
- HUANG, G. R.; ZHAO, J.; JIANG, J. X. Effect of defatting and enzyme type on antioxidative activity of shrimp processing byproducts hydrolysate. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 651–657, 2011.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE: Estatística de produção pecuária**. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp_2018_mar.pdf>. Acesso em: 6 maio. 2019.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985.
- IPEA- INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. Diagnóstico dos resíduos orgânicos do setor agropartoril e agroindústrias associadas. p. 1–134, 2012.
- IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization - aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1019–1032, 2008.
- JANATI-FARD, F.; HOUSAINDOKHT, M. R.; MONHEMI, H.; NAKHAEIPOUR, A. How a multimeric macromolecule is affected by divalent salts? Experimental and simulation study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 284–292, 2018.
- JANG, H. L.; LICEAGA, A. M.; YOON, K. Y. Purification, characterisation and stability of an antioxidant peptide derived from sandfish (*Arctoscopus japonicus*) protein hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 433–442, 2016.
- JIANG, J.; CHEN, S.; REN, F.; LUO, Z.; ZENG, S. S. Yak milk casein as a functional

ingredient: Preparation and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 1, p. 18–25, 2007.

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

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, p. 41–60, 2009.

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

KECHAOU, E. S.; DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; JAOUEN, P.; GOUYGOU, J. P.; BERGÉ, J. P.; AMAR, R. BEN. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 158–164, 2009.

KETNAWA, S.; LICEAGA, A. M. Effect of microwave treatments on antioxidant activity and antigenicity of fish frame protein hydrolysates. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 3, p. 582–591, 2017.

KLOMKLAO, S.; KISHIMURA, H.; BENJAKUL, S. Use of viscera extract from hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*) for the production of protein hydrolysate from toothed ponyfish (*Gazza minuta*) muscle. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 1006–1012, 2013.

KONG, X.; ZHOU, H.; QIAN, H. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 759–763, 2007.

KUDDUS, M.; RAMTEKE, P. Recent developments in production and biotechnological applications of cold-active microbial proteases. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 330–338, 2012.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint.

Biotechnology Advances, v. 17, n. 7, p. 561–594, 1999.

KUMAR, N. S. S.; NAZEER, R. A.; GANESH, R. J. Functional properties of protein hydrolysates from different body parts of horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*). **Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 5, n. 2, p. 105–110, 2012.

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 5, p. 405–412, 2008.

LAPEÑA, D.; VUORISTO, K. S.; KOSA, G.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H. Comparative assessment of enzymatic hydrolysis for valorization of different protein-rich industrial byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 37, p. 9738–9749, 2018.

LASEKAN, A.; ABU, F.; HASHIM, D. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. **Waste Management**, v. 33, n. 3, p. 552–565, 2013.

LEE, H.; SUH, D. B.; HWANG, J. H.; SUH, H. J. Characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Bacillus* sp. SCB-3. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 123–133, 2002.

LEMES, A. C. **Obtenção e caracterização de queratinase de *Bacillus* sp. P45 a partir de coprodutos e aplicação na produção de queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa**. 2015. 181f. (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.

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

LI, B.; CHEN, F.; WANG, X.; JI, B.; WU, Y. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1135–1143, 2007.

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

1, p. 265–275, 1951.

MABROUK, M. E. M. Feather degradation by a new keratinolytic *Streptomyces* sp . MS-2. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 2331–2338, 2008.

MARGOT, A.; FLASCHELB, E.; RENKEN, A. Continuous monitoring of enzymatic whey protein soluble nitrogen content. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 257–262, 1994.

MÁRQUEZ, M. C.; VÁZQUEZ, M. A. Modeling of enzymatic protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 111–117, 1999.

MOHAMMAD, A. W.; KUMAR, A. G.; BASHA, R. K. Optimization of enzymatic hydrolysis of tilapia (*Oreochromis Spp.*) scale gelatine. **International Aquatic Research**, v. 7, n. 1, p. 27–39, 2014.

MOHORCIC, M.; TORKAR, A.; FRIEDRICH, J.; KRISTL, J.; MURDAN, S. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 38, n. 2, p. 196–201, 2007.

MONTILHA, M. S.; SBROGGIO, M. F.; FIGUEIREDO, V. R, G.; IDA, E. I.; KUROZAWA, L. E. Optimization of enzymatic protein hydrolysis conditions of okara with endopeptidase alcalase. **International food Research Journal**, v. 24, p. 1067–1074, 2017.

MORAIS, H.; SILVESTRE, M.; SILVA, V.; SILVA, M.; SILVA, A.; SILVEIRA, J. Correlation between the degree of hydrolysis and the peptide profile. **American Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2013.

MOTTA, V. T. **Bioquímica**. 2º ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2011.

MUKHOPADHYA, A.; NORONHA, N.; BAHAR, B.; RYAN, M. T.; MURRAY, B. A.; KELLY, P. M.; O'LOUGHLIN, I. B.; O'DOHERTY, J. V.; SWEENEY, T. Anti-inflammatory effects of a casein hydrolysate and its peptide-enriched fractions on TNF α -challenged Caco-2 cells and LPS-challenged porcine colonic explants. **Food Science and Nutrition**, v. 2, n. 6, p. 712–723, 2014.

MURADOR, D.; BRAGA, A. R.; CUNHA, D. DA; DE, V. Alterations in phenolic compound levels and antioxidant activity in response to cooking technique effects: A meta-analytic investigation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 2, p. 169–177,

2018.

MURAKAMI, Y.; KAWATA, A.; KATAYAMA, T.; FUJISAWA, S. Anti-inflammatory activity of the artificial antioxidants 2-Tert-butyl-4-methoxyphenol (BHA), 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) and 2,4,6-tri-tert-butylphenol (TBP), and their various combinations. **In Vivo**, v. 29, n. 2, p. 197–206, 2015.

MUSTĂȚEA, G.; UNGUREANU, E. L.; IORGA, E. Protein acidic hydrolysis for amino acids analysis in food - progress over time. **Journal of Hygienic Engineering and Design**, v. 26, n. 1, p. 81–87, 2019.

NASCIMENTO, A. H.; GOMES, P. C.; ALBINO, L. F. T. Energia metabolizável e relação energia: Proteína bruta nas fases pré inicial e inicial de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 4, p. 911–918, 2004.

NELSON, D. L. .; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NETO, G. J. Qualidade nutricional do subproduto de graxaria avícola. **Abate e processamento de frangos**, p. 119–128, 1994.

NETO, G. P.; BUS, T. O. D. L.; AGUIAR, T. DE; SCHNEIDER, C. R.; KANIESKI, R.; ALMEIDA, A. N. DE. Avaliação dos impactos ambientais de atividade avicultora em Pinhal da Serra, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 5, n. 9, p. 41–48, 2018.

NGO, D. H.; RYU, B. M.; KIM, S. K. Active peptides from skate (*okamejei kenojei*) skin gelatin diminish angiotensin-i converting enzyme activity and intracellular free radical-mediated oxidation. **Food Chemistry**, v. 143, p. 246–255, 2014.

NGOH, Y. Y.; GAN, C. Y. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). **Food Chemistry**, v. 190, p. 331–337, 2016.

NIMALARATNE, C.; BANDARA, N.; WU, J. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. **Food Chemistry**, v. 188, p. 467–472, 2015.

- NONGONIERMA, A. B.; LE MAUX, S.; DUBRULLE, C.; BARRE, C.; FITZGERALD, R. J. Quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) protein hydrolysates with in vitro dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory and antioxidant properties. **Journal of Cereal Science**, v. 65, p. 112–118, 2015.
- OLAGUNJU, A. I.; OMOBA, O. S.; ENUJIUGHA, V. N.; ALASHI, A. M.; ALUKO, R. E. Pigeon pea enzymatic protein hydrolysates and ultrafiltration peptide fractions as potential sources of antioxidant peptides: An in vitro study. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, p. 269–278, 2018.
- OLIVEIRA, C. F.; COLETTI, D.; CORREA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; TONIOLO, R.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Antioxidant activity and inhibition of meat lipid oxidation by soy protein hydrolysates obtained with a microbial protease. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 775–781, 2014.
- OLIVEIRA, C. F.; CORRÊA, A. P. F.; COLETTI, D.; DAROIT, D. J.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Soy protein hydrolysis with microbial protease to improve antioxidant and functional properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 5, p. 2668–2678, 2015.
- ONIFADE, A. A.; AL-SANE, N. A.; AL-MUSALLAM, A. A.; AL-ZARBAN, S. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feather and other keratins as livestock feed resources. **Biosource Technology**, v. 66, p. 1–11, 1998.
- OVISSIPOUR, M.; RASCO, B.; SHIROODI, S. G.; MODANLOW, M.; GHOLAMI, S.; NEMATI, M. Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 7, p. 1718–1726, 2013.
- OVISSIPOUR, M.; SAFARI, R.; MOTAMEDZADEGAN, A.; SHABANPOUR, B. Chemical and biochemical hydrolysis of persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 460–465, 2009.
- OWUSU-APENTEN, R. **Introduction to Food Chemistry**. 1. ed. New York: CRC Press, 2004.

PALMQVIST, B.; WIMAN, M.; LIDÉN, G. Effect of mixing on enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce: A quantitative analysis of conversion and power consumption.

Biotechnology for Biofuels, v. 4, p. 1–8, 2011.

PAN, L.; MA, X. K.; WANG, H. L.; XU, X.; ZENG, Z. K.; TIAN, Q. Y.; ZHAO, P. F.; ZHANG, S.; YANG, Z. Y.; PIAO, X. S. Enzymatic feather meal as an alternative animal protein source in diets for nursery pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 212, p. 112–121, 2016.

PATINVOH, R. J.; FEUK-LAGERSTEDT, E.; LUNDIN, M.; SÁRVÁRI HORVÁTH, I.; TAHERZADEH, M. J. Biological pretreatment of chicken feather and biogas production from total broth. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, p. 1401–1415, 2016.

PEINADO, I.; KOUTSIDIS, G.; AMES, J. Production of seafood flavour formulations from enzymatic hydrolysates of fish by-products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 444–452, 2016.

PINTO, L. A. M.; PINTO, M. M.; BOVO, J.; MATEUS, G. A. P.; TAVRES, F. O.; BAPTISTA, A. T. A.; HIRATA, A. K. Aspectos ambientais do abate de aves: Uma revisão. **Revista UNINGÁ**, v. 22, n. 3, p. 44–50, 2015.

POKORNÝ, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science and Technology**, v. 2, p. 223–227, 1991.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.

REED, G. **Enzymes in food processing**. 2. ed. London: Academic Press, 1975.

RIFFEL, A.; LUCAS, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives of Microbiology**, v. 179, p. 258–265, 2003.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 395–399, 2006.

ROBERTO, I. C.; SATO, S.; MANCILHA, I. M.; TAQUEDA, M. E. S. Influence of media

composition on xylitol fermentation by *Candida guilliermondii* using response surface methodology. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 11, p. 1223–1228, 1995.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; FARIA, A. F.; MERCADANTE, A. Z. Microcapsules containing antioxidant molecules as scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 704–711, 2012.

RODRÍGUEZ-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, n. 7, p. 938–949, 2011.

ROMERO, F. J.; GARCÍA, L. A.; SALAS, J. A.; DÍAZ, M.; QUIRÖS, L. M. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 507–515, 2001.

ROSSINI, K.; NOREÑA, C. P. Z.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Casein peptides with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates and mechanically deboned poultry meat. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 4, p. 862–867, 2009.

RUTHERFURD-MARKWICK, K. J.; MOUGHAN, P. J. Bioactive peptides derived from food. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 3, p. 955–966, 2005.

RUTHERFURD, S. M. Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: A review. **Journal of AOAC International**, v. 93, n. 5, p. 1515–1522, 2010.

SANTOS AGUILAR, J. G.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253–262, 2018.

SARAVANAN, K.; DHURAI, B. Exploration on amino acid content and morphological structure in chicken feather fiber. **Journal of Textile and Apparel, Technology and Management**, v. 7, n. 3, p. 1–6, 2012.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949–1956, 2010.

SEO, H. W.; JUNG, E. Y.; GO, G. W.; KIM, G. D.; JOO, S. T.; YANG, H. S. Optimization of hydrolysis conditions for bovine plasma protein using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 185, p. 106–111, 2015.

SHERIFF, S. A.; SUNDARAM, B.; RAMAMOORTHY, B.; PONNUSAMY, P. Synthesis and in vitro antioxidant functions of protein hydrolysate from backbones of *Rastrelliger kanagurta* by proteolytic enzymes. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 19–26, 2014.

SILVA, V. M.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Optimization of the enzymatic hydrolysis of mussel meat. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, p. 36–42, 2010.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1484–1491, 2007.

SIRTORI, L. R.; CLADERA-OLIVERA, F.; LORENZINI, D. M.; TSAI, S.-M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 357–363, 2006.

SOBUCKI, L.; RAMOS, R. F.; GUBIANI, E.; BRUNETTO, G.; KAISER, D. R.; DAROIT, D. J. Feather hydrolysate as a promising nitrogen-rich fertilizer for greenhouse lettuce cultivation. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, p. 1–7, 2019.

SOUZA, P. M.; LISA, M.; BITTENCOURT, A.; CAPRARA, C. C.; FREITAS, M.; PAULA, R.; ALMEIDA, C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; XIMENES, E.; FILHO, F.; JUNIOR, A. P.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337–346, 2015.

SPELLMAN, D.; MCEVOY, E.; O’CUINN, G.; FITZGERALD, R. J. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 6, p. 447–453, 2003.

STEINHARDT, J.; BEYCHOK, S. Interaction of proteins with hydrogen ions and other small ions and molecules. In: **The Proteins Composition Structure and Function**. 2. ed. New York: Academic Press, 1964. p. 139–304.

STUKNYTE, M.; NONI, I.; GUGLIELMETTI, S.; MINUZZO, M.; MORA, D. Potential immunomodulatory activity of bovine casein hydrolysates produced after digestion with proteinases of lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 10, p. 763–769, 2011.

SUPPAVORASATIT, I.; MEJIA, E. G.; CADWALLADER, K. R. Optimization of the enzymatic deamidation of soy protein by protein-glutaminase and its effect on the functional properties of the protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 11621–11628, 2011.

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

TESFAYE, T.; SITHOLE, B.; RAMJUGERNATH, D.; CHUNILALL, V. Valorisation of chicken feathers: Characterisation of chemical properties. **Waste Management**, v. 68, p. 626–635, 2017a.

TESFAYE, T.; SITHOLE, B.; RAMJUGERNATH, D.; CHUNILALL, V. Valorisation of chicken feathers: Application in paper production. **Journal of Cleaner Production**, v. 164, p. 1324–1331, 2017b.

TESFAYE, T.; SITHOLE, B.; RAMJUGERNATH, D. Valorisation of chicken feathers: A review on recycling and recovery route—current status and future prospects. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 19, n. 10, p. 2363–2378, 2017.

THÉOLIER, J.; FLISS, I.; JEAN, J.; HAMMAMI, R. MilkAMP: A comprehensive database of antimicrobial peptides of dairy origin. **Dairy Science and Technology**, v. 94, n. 2, p. 181–193, 2014.

VAIRO CAVALLI, S.; SILVA, S. V.; CIMINO, C.; MALCATA, F. X.; PRIOLO, N. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. **Food Chemistry**, v. 106, n. 3, p. 997–1003, 2008.

VAN DER HOORN, R.; LEEUWENBURGH, M.; BOGYO, M.; JOOSTEN, M.; PECK, S. Activity profiling of papain-like cysteine proteases in plants. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1170–1178, 2004.

- VEERABADRAN, V.; BALASUNDARI, S. N.; DEVI, M. D.; KUMAR, D. J. M. Optimization and production of proteinacious chicken feather fertilizer by proteolytic activity of *Bacillus* sp. MPTK 6. **Indian Journal of Innovations and Developments**, v. 1, n. 3, p. 193–198, 2012.
- VERMELHO, A. B.; MELO, A. C. N.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S.; D'AVILA-LEVY, C. M.; COURI, S.; BON, E. P. Enzimas proteolíticas: Aplicações biotecnológicas. In: **Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 273–287.
- VIEIRA, M. A.; OLIVEIRA, D. D.; KUROZAWA, L. E. Production of peptides with radical scavenging activity and recovery of total carotenoids using enzymatic protein hydrolysis of shrimp waste. **Journal of Food Biochemistry**, v. 40, n. 4, p. 517–525, 2016.
- WANG, L.; ZHANG, B.; HAN, J.; ZHENG, Y.; LI, J.; SHAN, A. Optimization of hydrolysis condition of blood meal by *Bacillus subtilis* with response surface methodology. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 104, p. 112–117, 2015.
- WERLANG, P. O.; BRANDELLI, A. Characterization of a novel feather-degrading *Bacillus* sp. strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 120, n. 1, p. 71–79, 2005.
- WIRIYAPHAN, C.; XIAO, H.; DECKER, E. A.; YONGSAWATDIGUL, J. Chemical and cellular antioxidative properties of threadfin bream (*Nemipterus spp.*) surimi byproduct hydrolysates fractionated by ultrafiltration. **Food Chemistry**, v. 167, p. 7–15, 2015.
- WU, Y. B.; REN, X.; CHAI, X. J.; LI, P.; WANG, Y. Replacing fish meal with a blend of poultry by-product meal and feather meal in diets for giant croaker (*Nibea japonica*). **Aquaculture Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 1085–1091, 2017.
- ZARAÏ JAOUADI, N.; JAOUADI, B.; AGHAJARI, N.; BEJAR, S. The overexpression of the SAPB of *Bacillus pumilus* CBS and mutated sapB-L31I/T33S/N99Y alkaline proteases in *Bacillus subtilis* DB430: New attractive properties for the mutant enzyme. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 142–151, 2012.
- ZERDANI, I.; MOHAMED, F.; MALKI, A. Feather wastes digestion by new isolated strains *Bacillus* sp. in Morocco. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 67–70, 2004.

ZHANG, H.; YU, L.; YANG, Q.; SUN, J.; BI, J.; LIU, S.; ZHANG, C.; TANG, L. Optimization of a microwave-coupled enzymatic digestion process to prepare peanut peptides. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 5661–5674, 2012.

ZHANG, J.; WANG, J.; ZHAO, Y.; LI, J.; LIU, Y. Study on the interaction between calcium ions and alkaline protease of *Bacillus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 121–130, 2019.

ZHANG, M.; MU, T. H. Identification and characterization of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase under high hydrostatic pressure. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 43, p. 92–101, 2017.

ZHENG, Y.; CHEN, Q.; SHAN, A.; ZHANG, H. Optimisation of the enzymatic hydrolysis of blood cells with a neutral protease. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

ZIN, G.; PENHA, F. M.; REZZADORI, K.; SILVA, F. L.; GUIZONI, K.; PETRUS, J. C. C.; OLIVEIRA, J. V.; DI LUCCIO, M. Fouling control in ultrafiltration of bovine serum albumin and milk by the use of permanent magnetic field. **Journal of Food Engineering**, v. 168, p. 154–159, 2016.