



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

MARTA OLIVEIRA DE ARAÚJO

**PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS POR ENZIMAS PROTEOLÍTICAS
DE *ASPERGILLUS ORYZAE* E *ASPERGILLUS NIGER***

Brasília, DF

2022

MARTA OLIVEIRA DE ARAÚJO

**PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS POR ENZIMAS PROTEOLÍTICAS
DE *ASPERGILLUS ORYZAE* E *ASPERGILLUS NIGER***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada
como requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

BRASÍLIA, DF
2022

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ap Araújo, Marta
Produção de hidrolisados proteicos por enzimas
proteolíticas de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* /
Marta Araújo; orientador Daniela Orsi. -- Brasília, 2022.
54 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2022.

1. Hidrolisados proteicos. 2. Proteases fúngicas. 3.
Peptídeo bioativo. 4. *Aspergillus oryzae*. 5. *Aspergillus
niger*. I. Orsi, Daniela, orient. II. Título.

MARTA OLIVEIRA DE ARAÚJO

**PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS POR ENZIMAS PROTEOLÍTICAS
DE *ASPERGILLUS ORYZAE* E *ASPERGILLUS NIGER***

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
(FCE/ Universidade de Brasília)

Farmacêutica: Letícia Fernandes Silva Rodrigues
(Aluna de Doutorado em Ciências e Tecnologias da Saúde | Universidade de
Brasília)

Farmacêutica: Carla Azevedo Bilac
(Aluna de Mestrado em Ciências e Tecnologias em Saúde | Universidade de
Brasília)

Brasília, DF

2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida e por ter iluminado todo o meu caminho.

Aos meus pais, Antonio e Sandra, por todo o esforço e dedicação por terem me criado, por terem me apoiado em todos os momentos da minha vida. Se não fosse todo o empenho de vocês eu não estaria aqui. Aos dois, todo meu amor e gratidão.

Às minhas irmãs, Isabel e Júlia, por todas as risadas, carinho, companheirismo e por todo o incentivo.

Ao meu namorado, Rafael, por todo amor e carinho, paciência, companheirismo e pela compreensão aos momentos de ausência.

À minha médica, Dra. Renata, por ter me cuidado com muito carinho e amor por todos esses anos da minha saúde, obrigada pela sua amizade.

A todos os amigos que fiz na UnB, em especial a Caroline Dias, Lucas Oliveira, Adones Oliveira, Francielly Fialho, Douglas Reis, Lorrane Antunes, Kettle Souza, Matheus Eça, Nathalia Carvalho, Marcella Reginato, e aos demais.

À minha orientadora, Daniela Castilho Orsi, por toda a ajuda e dedicação por me ajudar nesse trabalho.

Por fim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, seja de forma direta ou indireta.

RESUMO

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo a produção e aplicação de proteases dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*. As proteases produzidas por *A. niger* e *A. oryzae* mostraram estabilidade na faixa de 50 a 60 °C, com uma maior atividade em 55 °C. A atividade proteolítica máxima do extrato enzimático bruto obtido do *A. niger* ocorreu em pH 4,0 e do extrato enzimático bruto de *A. oryzae* em pH 7,0. O grau de hidrólise da caseína foi maior quando se utilizou as proteases de *A. niger* (70,86%) em comparação com as proteases de *A. oryzae* (30,21%). Os hidrolisados de caseína produzidos tanto por *A. oryzae* quanto por *A. niger* apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante nos métodos de ABTS (1096,5 - 1336,00 Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) e DPPH (1061,14-1301,14 Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$). Os hidrolisados de extrato de carne, extrato de levedura e proteína de soja apresentaram valores de atividade antioxidante variando de 502,28 a 634,00 Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ no método de ABTS e de 357,85 a 703,42 Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ no método de DPPH. Ambos os extratos enzimáticos de *A. oryzae* e *A. niger* possuíram capacidade de coagulação do leite, havendo separação entre o soro do leite e a massa coagulada. Os resultados deste trabalho são importantes para as futuras aplicações dessas enzimas, que poderão ser utilizadas na produção de hidrolisados proteicos contendo peptídeos bioativos com atividade antioxidante.

Palavras-chave: proteases fúngicas; hidrolisado proteico; atividade antioxidante; peptídeo bioativo; *Aspergillus oryzae*; *Aspergillus niger*.

ABSTRACT

The present study aimed at the production and application of proteases from the *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* fungi. The proteases produced by *A. niger* and *A. oryzae* showed stability in the range of 50 to 60 °C, with a higher activity at 55 °C. The maximum proteolytic activity of the crude enzymatic extract obtained from *A. niger* occurred at pH 4.0 and of the crude enzymatic extract from *A. oryzae* at pH 7.0. The degree of casein hydrolysis was higher when using proteases from *A. niger* (70.86%) compared to proteases from *A. oryzae* (30.21%). The casein hydrolysates produced by both *A. oryzae* and *A. niger* showed the highest values of antioxidant activity in the ABTS (1096.5 - 1336.00 Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) and DPPH (1061.14-1301.14 Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) methods. The hydrolysates of meat extract, yeast extract and soy protein showed antioxidant activity values ranging from 502.28 to 634.00 Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ in the ABTS method and from 357.85 to 703.42 Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ in the DPPH method. Both enzymatic extracts of *A. oryzae* and *A. niger* had the ability to coagulate the milk, with separation between the whey and the coagulated mass. The results of this study are important for future applications of these enzymes, which could be used in the production of protein hydrolysates containing bioactive peptides with antioxidant activity.

Key-words: fungal proteases; protein hydrolysate; antioxidant activity; bioactive peptide; *Aspergillus oryzae*; *Aspergillus niger*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagens do meio de cultivo de <i>A. oryzae</i> e <i>A. niger</i>	17
Figura 2. Imagens dos hidrolisados proteicos utilizando o substrato azocaseína 0,5% e as proteases <i>A. oryzae</i> e <i>A. niger</i>	30
Figura 3. Coagulação do leite com uso do extrato enzimático bruto de <i>A. oryzae</i>	39
Figura 4. Coagulação do leite com uso do extrato enzimático bruto de <i>A. niger</i>	39
Figura 5. Coagulação do leite com uso do coalho comercial HÁ-LA.....	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito da temperatura na atividade das proteases de <i>A. oryzae</i> em 30 e 60 min de reação.....	32
Gráfico 2. Efeito da temperatura na atividade das proteases de <i>A. niger</i> em 30 e 60 min de reação.....	32
Gráfico 3. Efeito da temperatura na atividade das proteases de <i>A. oryzae</i> , <i>A. niger</i> e coalho comercial em 30 min de reação.....	33
Gráfico 4. Efeito do pH na atividade das proteases de <i>A. oryzae</i>	34
Gráfico 5. Efeito do pH na atividade das proteases de <i>A. niger</i>	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das proteases de acordo com seu sítio ativo catalítico.....	15
Tabela 2. Fontes e aplicações das proteases.....	18
Tabela 3. Métodos de determinação de atividade antioxidante de peptídeos.....	22
Tabela 4. Atividade das proteases de <i>A. oryzae</i> e de <i>A. niger</i> sobre a azocaseína.....	30
Tabela 5. Efeito da temperatura na atividade das proteases de <i>A. oryzae</i> , <i>A. niger</i> e do coalho comercial.....	31
Tabela 6. Efeito do pH na atividade das proteases de <i>A. oryzae</i> e <i>A. niger</i>	34
Tabela 7. Grau de hidrólise após ação das proteases de <i>A. oryzae</i> ou <i>A. niger</i>	36
Tabela 8. Atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos pelo método de ABTS.....	37
Tabela 9. Atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos pelo método de DPPH.....	37

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
1.1. Proteases: fontes de produção e classificação.....	14
1.2. Uso dos fungos <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus oryzae</i> para produção de enzimas.....	16
1.3. Aplicação das proteases.....	17
1.4. Hidrolisados proteicos.....	19
1.5. Peptídeos biologicamente ativos (PBA) e peptídeos antioxidantes.....	20
2. Objetivos.....	23
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. Justificativa.....	24
4. Metodologia.....	25
4.1. Micro-organismos.....	25
4.2. Obtenção da solução de esporos para inocular os meios de cultivo na fermentação no estado sólido.....	25
4.3. Fermentação no estado sólido (FES) para obtenção do extrato enzimático bruto.....	25
4.4. Determinação da atividade proteolítica com uso do substrato azocaseína.....	26
4.5. Determinação da temperatura e do pH de estabilidade das proteases.....	26
4.6. Determinação do grau de hidrólise dos hidrolisados proteicos.....	26
4.7. Determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos.....	27
4.8. Aplicação dos extratos enzimáticos brutos de <i>A. oryzae</i> e <i>A. niger</i> na coagulação do leite.....	28
5. Resultados e discussão.....	30
5.1. Atividade das proteases de <i>A. oryzae</i> e de <i>A. niger</i>	30

5.2. Efeito da temperatura na estabilidade enzimática das proteases de <i>A. oryzae</i> , <i>A. niger</i> e do coalho comercial.....	31
5.3. Efeito do pH na estabilidade enzimática das proteases de <i>A. oryzae</i> e <i>A. niger</i>	34
5.4. Determinação do grau de hidrólise dos hidrolisados proteicos.....	35
5.5. Determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos pelo método de ABTS e DPPH.....	37
5.6. Aplicação dos extratos enzimáticos brutos do <i>A. oryzae</i> e <i>A. niger</i> na coagulação do leite.....	38
6. Conclusão.....	40
Referências Bibliográficas.....	41
Anexos.....	46

1 INTRODUÇÃO

As proteases ou enzimas proteolíticas constituem um grande grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas das proteínas em peptídeos e aminoácidos, sendo encontradas em todos os organismos vivos e são essenciais para o crescimento e diferenciação celular. As enzimas proteolíticas têm aplicação potencial na indústria de alimentos, de detergentes e de produtos farmacêuticos (CASTRO et al., 2014; SOUZA et al., 2015).

Os fungos filamentosos são usados em muitos processos industriais para a produção de enzimas e metabólitos. Entre as muitas vantagens oferecidas pela produção de enzimas por fungos estão o baixo custo aliado a alta produtividade. Além disso, as enzimas, sendo normalmente extracelulares, são facilmente recuperáveis do meio (VISHWANATHA et al., 2010). A produção de proteases de origem fúngica tem uma vantagem sobre a protease bacteriana, pois os micélios podem ser facilmente removidos por filtração. Além disso, o uso de fungos como produtores de enzimas é mais seguro do que o uso de bactérias, já que normalmente são reconhecidos como GRAS (geralmente considerados seguros) (SOUZA et al., 2015).

As espécies de *Aspergillus* estão entre os fungos mais abundantes no mundo todo. Eles não são muito seletivos com respeito às condições de crescimento abiótico. Com isso, podem crescer em uma ampla faixa de temperatura (6-55 °C) e com umidade relativamente baixa. As enzimas microbianas, em comparação com as de animais e plantas oferecem várias vantagens, incluindo ampla variedade de atividades catalíticas disponíveis, e grande estabilidade para pH e temperatura (KRJGSHELD et al., 2012).

Os hidrolisados proteicos têm sido utilizados desde 1940 com finalidades médicas na preparação de dietas especiais para alimentação enteral de bebês e para manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir proteínas (SOUZA et al., 2015).

Os hidrolisados proteicos têm como vantagem a liberação de peptídeos bioativos. Os peptídeos bioativos são pequenas cadeias de aminoácidos que têm um impacto positivo nas funções ou condições do corpo e podem influenciar benéficamente a saúde (OLIVEIRA FILHO, 2018). Os peptídeos bioativos são inativos enquanto criptografados na sequência da proteína original, mas podem ser liberados por (a) hidrólise por enzimas digestivas, (b) microrganismos proteolíticos e/ou (c) ação

de proteases vegetais ou microbianas (BRANDELLI et al., 2015). Esses peptídeos podem apresentar capacidade anti-hipertensiva, antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana ou imunomoduladora, entre outras atividades biologicamente relevantes, com potenciais benéficos à saúde dos consumidores. A capacidade antioxidante é de interesse não apenas como nutracêutico, mas também como conservante de alimentos devido à sua capacidade de prevenir ou retardar as reações oxidativas lipídicas (ESPERANÇA et al., 2020).

1.1 Proteases: fontes de produção e classificação

Proteases (peptidases ou enzimas proteolíticas) constituem um grande grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em outras proteínas (SOUZA et al., 2015). Essas enzimas são encontradas em uma ampla diversidade de fontes, como plantas, animais e microrganismos. Destas fontes, os microrganismos apresentam grande potencial para produção de protease devido à sua ampla diversidade bioquímica e sua suscetibilidade à manipulação genética. Além disso, as proteases microbianas são predominantemente extracelulares e podem ser secretadas no meio de fermentação, diminuindo a necessidade de etapas complexas para a recuperação enzimática (CASTRO et al., 2014).

As enzimas proteolíticas são subdivididas em 2 grupos principais dependendo de seu local de ação: exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases atuam apenas próximo às extremidades das cadeias polipeptídicas. Com base em seu local de ação no terminal N ou C, são classificadas como amino e carboxipeptidase. As aminopeptidases atuam no N-terminal da proteína e as carboxipeptidases atuam no C-terminal da proteína e podem ser divididas em 3 grupos principais: serina peptidase, metalopeptidase e cisteína peptidase. As endopeptidases são divididas em 4 subgrupos com base em seu mecanismo catalítico: serina proteases, cisteína proteases, proteases aspárticas e metaloprotease (Tabela 1) (SOUZA et al., 2015).

Tabela 1 – Classificação das proteases de acordo com seu sítio ativo catalítico

Protease	EC nº
<i>Exopeptidases</i>	
Aminopeptidases	3.4.14
Carboxipeptidase	3.4.16-3.4.18
Serina peptidase	3.4.16
Metalopeptidase	3.4.17
Cisteína peptidase	3.4.18
<i>Endopeptidases</i>	
Serina protease	3.4.21
Cisteína protease	3.4.22
Protease aspártica	3.4.23
Metaloprotease	3.4.24

FONTE: Adaptado de SOUZA et al. (2015).

As proteases podem ser divididas também em relação a faixa de pH: proteases ácidas, neutras e básicas. As proteases ácidas são encontradas em células animais, fungos e leveduras, mas raramente em bactérias. As proteases semelhantes à renina microbiana são derivadas de *Mucor miehei*, *M. pusillus* e outras espécies de *Mucor*. As proteases ácidas semelhantes à pepsina são derivadas de *Aspergillus* spp. e *Rhizopus* spp. (SUMANTHA et al., 2006).

Proteases neutras, como papaína (de *Carica papaya*), bromelaína (de *Ananas comorus*) são algumas proteases de origem botânica. Algumas espécies de *Bacillus* spp. produzem metaloprotease neutras. As proteases fúngicas neutras são os componentes mais importante das preparações comerciais de panificação, processamento de alimentos, aplicações farmacêuticas. O *Aspergillus oryzae* é a principal fonte de protease neutra fúngica (SUMANTHA et al., 2006).

As proteases básicas são as serina proteases e são produzidas principalmente por *Bacillus* spp. São empregadas principalmente na indústria de alimentos (SUMANTHA et al., 2006).

1.2 Uso dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* para produção de enzimas

As proteases são umas das enzimas mais importantes nas indústrias. São encontradas em várias espécies de fungos como *Penicillium* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. e *Aspergillus* sp. e em bactérias também como *Bacillus* sp. (SUMANTHA et al., 2006).

Entre as muitas vantagens oferecidas pela produção de enzimas por fungos em processos industriais estão o baixo custo do material aliado a alta produtividade, produção mais rápida e a facilidade com que as enzimas podem ser modificadas (VISHWANATHA et al. 2010).

As espécies de *Aspergillus* estão entre os fungos mais abundantes em todo o mundo. Pertencem ao reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, ordem dos *Eurotiales*, família *Trichocomaceae* e gênero *Aspergillus*. Não são muito seletivos em relação às condições de crescimento abiótico e podem crescer em uma ampla faixa de temperatura (6-55 °C) e com uma umidade relativamente baixa. Além disso, as espécies *Aspergillus* se alimentam de uma grande variedade de substratos, incluindo fezes de animais e tecido humano. São considerados fungos comuns de deterioração de alimentos (KRJGSHELD et al., 2012).

As espécies mais conhecidas são a *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e o *A. versicolor*. Esses fungos podem se reproduzir assexuadamente e sexuadamente. A germinação de um esporo pode levar a um micélio vegetativo que coloniza um substrato. As hifas dentro do micélio são altamente heterogêneas no que diz respeito à expressão, crescimento e secreção gênica. Suas colônias podem ser de diversas colorações como branca, rosada, amarela, verde, entre outras cores (PEREIRA 2014; KRJGSHELD et al., 2012).

O *Aspergillus oryzae* é um fungo Ascomiceta e pertence ao gênero *Aspergillus* seção *Flavi*. Essa seção é caracterizada morfológicamente por espécies com conídios em tons de amarelo escuro a marrom, esterigmatas uni e bisseriados, e esclerócios escuros. Crescem na superfície de materiais sólidos, como vapor de arroz, soja moída ou subprodutos agrícolas, como farelo de trigo e muitos outros substratos, onde aminoácidos e açúcares são inicialmente deficientes. O *A. oryzae* produz vários tipos de enzimas como amilases, celulases, pectinases, flicosidases, lipases, proteases e peptidases (MONCLARO, 2014; VISHWANATHA et al. 2009; PEREIRA, 2014).

A produção de xilanases por *A. oryzae* é relatada desde a década de 1980 na ração animal, no branqueamento de polpa de celulose e na sacarificação de resíduos agroindustriais em indústria têxtil. Já foram relatadas também produção de 6 xilanases e 3 β -xilosidases envolvidas na produção de molho de shoyo, com características termotolerantes e halotolerantes (MONCLARO, 2014).

O *Aspergillus niger* pertence a seção *Nigri* do gênero *Aspergillus*. É um fungo filamentoso que cresce aerobiamente na matéria orgânica. Na natureza, é encontrado no solo e lixo, em composto e em material vegetal em decomposição. O *A. niger* é capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura (6-47 °C) com uma temperatura ótima relativamente alta de 35-37 °C. Suas colônias apresentam cores esbranquiçadas a amareladas, e também ocorre um rápido crescimento de esporos negros. Esse fungo é amplamente utilizado em processos biotecnológicos para a produção de ingredientes alimentícios, farmacêuticos e produção de enzimas de aplicação industrial. *A. niger* produz uma grande quantidade de ácido cítrico e secretam uma grande quantidade de enzimas como: proteases, pectinases, amiloglicosidase, α -amilase, celulasas, lipases, glicose oxidase e catalase. Uma importante vantagem associada ao uso desse fungo é o manuseio seguro pelo homem durante a produção de enzimas e ácidos orgânicos (SCHUSTER et al., 2002; MILANEZI, 2010).

Figura 1 – Imagens do meio de cultivo de *A. oryzae* e *A. niger*



1.3 Aplicações das proteases

As proteases fúngicas possuem inúmeras aplicações nas indústrias alimentícia e química. Na indústria de alimentação, apresentam um papel fundamental na

fabricação de cervejas, na maturação de queijos, no amaciamento de carnes, na produção de hidrolisados funcionais, na panificação, na produção de adoçantes artificiais, entre outros. A tabela 2 ilustra as diversas origens de proteases e suas respectivas aplicações industriais (SILVA, 2013).

Tabela 2 – Fontes e aplicações das proteases

Fonte	Enzima	Aplicação industrial
Animal	Tripsina, Quimotripsina	Indústria farmacêutica, de couro, processamento de alimentos, hidrólise de proteínas e síntese de peptídeos.
Vegetal	Papaína, Ficina, Bromelaína	Produção de extratos de leveduras, cerveja resistente ao congelamento, panificação, fármacos, amaciamento de carne.
<i>Aspergillus niger</i>	Proteases ácidas e neutras	Queijos, carnes, pescado, cereais, bebidas
<i>Aspergillus oryzae</i>	Proteases ácidas e neutras	Hidrólise proteica, processamento de carne e pescado, indústria cervejeira e panificação.
<i>Aspergillus melleus</i> , <i>Endorthia</i> <i>parasítica</i> , <i>Mucor miehei</i> e <i>Mucor pursilus</i>	Proteases alcalinas	Manufatura de queijo (coagulação do leite).
<i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	Proteases alcalinas	Fabricação de detergentes e indústria de couro, processamento de carnes, pescados e derivados lácteos.
<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus cereus</i>	Protease neutra	Produção de bebidas e panificação.

FONTE: Adaptado de SILVA, (2013).

As proteases bacterianas são usadas para melhorar as propriedades funcionais, nutricionais e sabor das proteínas. Proteases neutras são usadas na produção de álcool para melhorar o crescimento da levedura. Na panificação, é usada para degradar as proteínas de farinha para bolachas, biscoitos de “água e sal” ou *cracker*. Na fabricação de cerveja, é usado para extrair proteínas suficientes do malte e da cevada e, para obter o nível desejado de nutrientes de nitrogênio. Também está envolvido na redução da lactose e modificação do sabor em aplicações de laticínios. Na indústria de laticínios, as proteases ácidas tem uma importância por ter uma grande capacidade de coagular proteínas do leite (caseína) para formar a coalhada, a partir do qual o queijo é preparado após a remoção do soro de leite (SUMANTHA et al., 2006).

As proteases também são utilizadas em usos farmacêuticos. Por exemplo, elas podem ser usadas como anti-hipertensivos e antioxidantes. Proteases de *Aspergillus* encontram aplicação como auxiliares digestivos em distúrbios gastrointestinais, como dispepsia. A collagenase, que hidrolisa o colágeno nativo, tem sido usada para desbridamento de úlceras dérmicas e queimaduras. A uroquinase tem sido usada para o tratamento de distúrbios de coagulação (SUMANTHA et al., 2013; TAVANO et al., 2018).

1.4 Hidrolisados proteicos

Os hidrolisados proteicos têm sido utilizados desde 1940 com finalidades médicas na preparação de dietas especiais para alimentação enteral de bebês e para manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir proteínas. A utilização de hidrolisados proteicos, em formulações específicas é uma área de crescente interesse. São utilizados principalmente em indivíduos que não conseguem digerir totalmente a proteína pura. Principalmente os hidrolisados ricos em peptídeos de baixo peso molecular, especialmente di- e tripeptídeos, com o mínimo possível de aminoácidos livres, demonstram possuir mais utilizações alimentares, devido aos seus valores nutricionais e terapêuticos aumentados. Estes hidrolisados vêm sendo empregados na fabricação de alimentos especiais, para diversos grupos, tais como recém-nascidos prematuros, crianças com diarreia, gastroenterite, má-absorção e fenilcetonúria e pessoas com alergia a proteínas. Além disso, estes preparados enzimáticos podem ser úteis na suplementação dietética de idosos, pacientes

portadores de HIV/AIDS, pacientes com Crohn, colite ulcerativa e na nutrição de esportistas, bem como em dietas para controle de peso (OLIVEIRA et al., 2015; CARREIRA et al., 2011; PACHECO et al., 2005).

A hidrólise de proteínas é um processo de grande importância que tem sido utilizado para melhorar propriedades físicas, químicas e funcionais dos alimentos, sem prejudicar seu valor nutritivo, melhorando, particularmente, as características de absorção das proteínas. Além dos efeitos benéficos na manutenção do estado nutricional, os hidrolisados proteicos apresentam várias aplicações na indústria alimentícia associadas à melhoria das propriedades funcionais. Nesse sentido, estes hidrolisados são utilizados como ingredientes em vários alimentos, como patês, pães, doces, produtos alimentícios fortificados para crianças (PACHECO et al., 2005).

Outros benefícios dos hidrolisados proteicos é à fácil digestibilidade, alta solubilidade em água, resistência a agentes desnaturantes, longa vida de prateleira (na forma desidratada) e na baixa viscosidade de soluções, mesmo em altas concentrações. Os hidrolisados proteicos também exercem diversas atividades benéficas ao organismo, como antitrombótica, anticariogênica, antimicrobiana, antioxidante, antiulcerogênica, anti-hipertensiva e imunoestimulante (SILVA, 2010).

Para obter hidrolisados proteicos para fins nutricionais devem reunir alguns critérios de seleção, como: ser osmoticamente equilibrado, hipoalergênicos, funcionalidade, custo, sabor aceitável, sendo que o valor nutritivo do hidrolisado deve permanecer próximo da proteína original quanto possível. As proteínas mais utilizadas para a produção de hidrolisados proteicos são: as derivadas do leite (caseína e proteínas do soro do leite), soja, trigo, carne e pescado (CARREIRA et al., 2011; PACHECO et al., 2005).

1.5 Peptídeos biologicamente ativos (PBA) e peptídeos antioxidantes

Os hidrolisados proteicos têm como vantagem a liberação de peptídeos bioativos (PBA) que têm um impacto positivo nas funções ou condições do corpo e podem influenciar benéficamente a saúde (OLIVEIRA, 2018).

Os peptídeos bioativos são sequências de aminoácidos que se encontram inativas nas proteínas nativas, mas após um processo de hidrólise, *in vitro* ou *in vivo*, tornam-se ativas, sendo capazes de modular respostas fisiológicas no organismo. Dentre as funções que estes peptídeos podem desempenhar destacam-se as

atividades imunomoduladora, antimicrobiana, antiúlcera, anti-hipertensiva, anticarcinogênica, anticoagulante, opioide e antioxidante. Portanto, há perspectivas de serem incorporados como ingredientes em alimentos funcionais, nutracêutico e medicamentos, onde essas bioatividades podem ser aliadas no controle e prevenção de doenças (CASTRO, 2012; SILVA, 2010).

Os peptídeos bioativos podem ser produzidos das seguintes maneiras: (a) hidrólise enzimática por enzimas digestivas, (b) microrganismos proteolíticos, (c) proteólise por enzimas derivadas de plantas. A maneira mais comum para a produção de peptídeos bioativos é através da hidrólise enzimática de proteínas nativas e as principais fontes são de origem animal (suína, frango, pescado e ovos) e vegetal (soja, trigo), porém as proteínas do leite são consideradas a fonte mais importante de peptídeos bioativos (CORRÊA, 2013; SILVA, 2010).

A formação de radicais livres como superóxido (O_2) e hidroxila (OH), é uma consequência inevitável em organismos aeróbios durante a respiração. Estes radicais são instáveis e reagem rapidamente no organismo, ocasionando lesões celulares, nos tecidos, mutações no DNA, oxidação de fosfolípidios e modificação no LDL. Com isso, pode desenvolver várias doenças como aterosclerose, artrite, diabetes e câncer. Em alimentos, a oxidação também afeta na qualidade, comprometendo o sabor, aroma e coloração (CORRÊA, 2013).

Peptídeos gerados a partir da digestão de diferentes proteínas são relatadas como possuidores de atividades antioxidantes. A procura por antioxidantes naturais se estendeu para proteínas e peptídeos de origem animal e vegetal. São considerados importantes nutracêuticos apresentando diversos benefícios à saúde. Os antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de inibir ou retardar substancialmente a oxidação daquele substrato. Os antioxidantes não se tornam radicais livres pela doação de elétrons, pois eles são estáveis em ambas as formas (CASTRO, 2012; CORRÊA, 2013)

Existem os antioxidantes sintéticos e os naturais. Os antioxidantes artificiais como o BHA, BHT e n-propil-galato, apresentam riscos potenciais *in vitro*, sendo seu uso restrito ou proibido. Antioxidantes naturais (animal e vegetal) possuem capacidade antioxidante similar ou superior em relação aos sintéticos, sendo uma fonte segura para aplicação em alimentos (CASTRO, 2012).

Os mecanismos de ação que explicam a atividade antioxidante de peptídeos não são totalmente compreendidos, mas estudos mostraram a capacidade de peptídeos em inibir a peroxidação lipídica, eliminar radicais livres, quelar íons metálicos e eliminar espécies reativas de oxigênio. Assim, como para outras atividades biológicas, as propriedades antioxidantes dos peptídeos estão relacionadas com sua composição, estrutura e hidrofobicidade (CASTRO, 2012). A capacidade antioxidante de peptídeos pode ser avaliada por diversos métodos e diferentes mecanismos de ação (Tabela 3).

Tabela 3 – Métodos de determinação de atividade antioxidante de peptídeos

Método	Mecanismo	Reação	Medida realizada
DPPH	Captura do radical DPPH	O radical DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil) reage com antioxidantes doadores de hidrogênio, com mudança de coloração violeta para amarela.	Redução da absorvância a 517 nm
ORAC	Captura do radical peroxila	O radical peroxila, gerado pela decomposição de AAPH (dicloreto de 2,2'-azobis (2-aminopropano) na presença de oxigênio atmosférico, reagem com um indicador fluorescente formando um produto não fluorescente. Na presença de antioxidantes, a fluorescência é preservada.	Redução de fluorescência (excitação a 485 nm e emissão a 520 nm)
ABTS	Captura do radical ABTS	O radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) é estabilizado na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, com mudança de coloração verde escura para verde clara.	Redução da absorvância a 734 nm

FONTE: Adaptado de CASTRO (2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Sendo assim, o presente trabalho de pesquisa teve como objetivo produzir hidrolisados proteicos com o uso de enzimas proteolíticas de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*.

2.2 Objetivos específicos:

- Determinar a atividade das proteases usando azocaseína como substrato da reação;
- Determinar a temperatura e o pH de estabilidade das proteases;
- Determinar o grau de hidrólise dos hidrolisados proteicos;
- Determinar a atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos;
- Aplicar os extratos enzimáticos na coagulação do leite.

3 JUSTIFICATIVA

A utilização de hidrolisados proteicos vem ganhando força devido ao fato de que preparações compostas por peptídeos menores apresentam a vantagem de serem absorvidas mais eficientemente e possuem um maior valor nutritivo do que as proteínas intactas ou do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres. Assim, os hidrolisados proteicos contendo aminoácidos livres e peptídeos pequenos, constituem uma alternativa às proteínas intactas e estão presentes em formulações especiais desenvolvidas para fornecer suporte nutritivo a pacientes com diferentes necessidades. Outra importante vantagem de aplicação dos hidrolisados proteicos é a liberação de peptídeos biologicamente ativos. Os peptídeos possuidores de atividade antioxidante podem ser utilizados com a finalidade de promover benefícios à saúde, na prevenção de várias doenças, como aterosclerose, artrite, diabetes e câncer, bem como na preservação de alimentos. O desenvolvimento de antioxidantes naturais é de extrema importância como alternativa aos antioxidantes sintéticos, uma vez que estes podem apresentar toxicidade quando usados em doses elevadas.

4 METODOLOGIA

4.1 Micro-organismos

Foram utilizadas as cepas dos fungos filamentosos *Aspergillus oryzae*, (Ahlburg) Cohn ATCC 12891 e *Aspergillus niger* van Tieghem (variedade awamori) ATCC 22342, adquiridas na Fundação André Tosello (Coleção de Culturas Tropicais).

4.2 Obtenção da solução de esporos para inocular os meios de cultivo na fermentação no estado sólido

O meio para produção de esporos foi constituído por 50 mL do Ágar Sabouraud dextrose distribuído em frascos Erlenmeyers de 250 mL, posteriormente inclinados e, após solidificação, o microrganismo foi repicado no mesmo. Após o crescimento do fungo (*A. oryzae* ou *A. niger*), incubado a 24°C por 7 dias, a biomassa formada na superfície do meio foi raspada com auxílio de uma espátula, adicionando-se 30 mL de água destilada estéril, para obter uma solução de esporos.

4.3 Fermentação no estado sólido (FES) para obtenção do extrato enzimático bruto

Como meio de cultivo no processo de FES para obtenção das proteases, foi utilizada farinha grossa de arroz (25 g), suplementada com 1% de peptona. A FES foi conduzida em Erlenmeyer de 1000 mL contendo 25 g de meio de cultivo e água destilada (75 mL) em quantidade suficiente para umedecer o substrato, sem deixar água aparente. Todos os Erlenmeyers foram autoclavados à 121°C por 20 min. Após o resfriamento, cada meio foi inoculado com uma suspensão de esporos de *A. oryzae* ou *A. niger* (3-4 mL, 10^5 - 10^6 esporos/g) e o material inoculado foi incubado à 24°C por 7 dias.

Após 7 dias de crescimento do fungo (*A. oryzae* ou *A. niger*), foi obtido um extrato enzimático bruto pela adição de 50 mL de água destilada. Essa suspensão foi homogeneizada com bastão de vidro, a massa foi triturada em liquidificador e em seguida foi centrifugada (10 min à 5000 rpm) para remoção dos sólidos. O

sobrenadante foi considerado o extrato enzimático bruto e foi conservado sob refrigeração a 8°C.

4.4 Determinação da atividade proteolítica com uso do substrato azocaseína

Para medir a atividade enzimática de cada extrato, a mistura da reação foi composta de 2,5 mL de solução de azocaseína 0,5% (p/v) e 2,0 mL de extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada em banho-maria na temperatura de 55°C e ao final de 30 min a reação foi interrompida pela adição de 2,5 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). O TCA tem a função de precipitar a caseína não hidrolisada, que fica retida na etapa de filtração. Para o controle, o TCA foi adicionado antes do extrato enzimático. O branco (sem adição de azocaseína) foi composto por 2,5 mL de água destilada, 2,0 mL de extrato enzimático e 2,5 mL de solução de TCA 10% (p/v). As amostras, o branco e o controle foram filtrados e a leitura dos filtrados foi feita a 428 nm, utilizando cubetas de quartzo. Uma unidade de atividade proteolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de 0,01 na absorbância entre o controle e a amostra.

4.5 Determinação da temperatura e do pH de estabilidade das proteases

Para medir a temperatura de estabilidade das proteases, a mistura de reação azocaseína e extrato enzimático foi feita conforme o item 4.4 e foi incubada a 25, 35, 45 e 55 °C e ao final de 30 min e 60 min a reação foi interrompida pela adição de TCA 10%. As demais etapas seguiram conforme o item 4.4.

Para medir o pH de estabilidade das proteases, 1,0 mL de cada extrato enzimático foi misturado com 1,0 mL das seguintes soluções tampão: acetato (pH 4,0 e 5,0) e fosfato (pH 6,0; 7,0 e 8,0), todos na concentração de 0,1 M. As misturas foram incubadas por 40 min em temperatura ambiente. Após 40 min de incubação, os testes de atividade proteolítica foram realizados conforme o item 4.4.

4.6 Determinação do grau de hidrólise dos hidrolisados proteicos

O grau de hidrólise (GH) foi definido como a porcentagem de grupamentos amino que foram liberados no rompimento da molécula proteica pela ação de enzimas

(RODRIGUES, 2014). Neste caso, o GH foi calculado por meio da relação entre as proteínas hidrolisadas e a proteína total da amostra de acordo com a equação 1:

$$\%GH = \frac{\text{proteínas hidrolisadas}}{\text{proteína total da amostra}} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

Para determinação das proteínas hidrolisadas e da proteína total da amostra foi utilizado o método do Biureto (GORNALL et al., 1949), onde se construiu uma curva padrão com concentrações conhecidas de caseína (ANEXO 1). A partir da equação da reta resultante da curva padrão de caseína foram realizados os cálculos de concentração de proteínas hidrolisadas e proteína total da amostra.

Para determinação da proteína total pesou-se 0,5 g de caseína, 1 g de extrato de carne e 1 g de extrato de levedura. Adicionou-se 20 mL de água destilada e 1 mL de NaOH 0,5 M. Aqueceu-se em micro-ondas até fervura. E completou-se o volume em balão de 100 mL, para obter as proteínas na concentração de caseína 0,5% (p/v) e extrato de carne e extrato de levedura 1,0% (p/v). Pipetou-se 1,0 mL de cada amostra de proteína e 4,0 mL do reagente de Biureto e após 30 min de repouso foi realizada a leitura da absorbância em 540 nm.

A hidrólise das proteínas em peptídeos foi determinada incubando-se 1,0 mL de solução de proteínas e 1,0 mL de extrato enzimático de *A. oryzae* ou *A. niger*, por 30 min na temperatura de 55°C. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) e realizou-se centrifugação para separação das proteínas não hidrolisadas. Os sobrenadantes contendo os peptídeos hidrolisados foram adicionados 4,0 mL de reagente de Biureto. Após 30 min de repouso, a leitura das amostras foi realizada a 540 nm.

4.7 Determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos

Para realizar a hidrólise proteica, a reação foi composta de 1,0 mL de solução 0,5% (p/v) das seguintes proteínas: caseína, extrato de carne, extrato de levedura e proteína de soja e 1,0 mL de extrato enzimático de *A. oryzae* ou *A. niger*. A mistura de reação foi incubada em banho-maria a 55°C por 30 min.

Então a atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos foi determinada pela metodologia do ABTS (radical 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)

(Sigma), conforme RUFINO et al. (2007a), com modificações. Para isso, transferiu-se uma alíquota de 20 μL de cada hidrolisado proteico para tubos de ensaio contendo 980 μL da solução do radical ABTS. A leitura foi realizada após 6 min a 734 nm, usando álcool etílico como branco. Construiu-se uma curva padrão com concentrações conhecidas de Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) (Sigma) (ANEXO 3). A partir da equação da reta resultante da curva padrão de Trolox foram realizados os cálculos de atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos. Os resultados foram expressos como μmol de Trolox equivalente $\cdot\text{g}^{-1}$ de hidrolisado proteico (Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$).

Também se determinou a atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos pela metodologia do DPPH (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil), conforme RUFINO et al. (2007b), com modificações. Para isso, transferiu-se uma alíquota de 0,1 mL de cada hidrolisado proteico para tubos de ensaio contendo 3,9 mL da solução do radical DPPH. A leitura foi realizada após 30 min a 517 nm, usando álcool etílico como branco. Construiu-se uma curva padrão com concentrações conhecidas de Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) (Sigma) (ANEXO 4). A partir da equação da reta resultante da curva padrão de Trolox foram realizados os cálculos de atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos. Os resultados foram expressos como μmol de Trolox equivalente $\cdot\text{g}^{-1}$ de hidrolisado proteico (Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$).

4.8 Aplicação dos extratos enzimáticos brutos do *A. oryzae* e *A. niger* na coagulação do leite

Para a aplicação dos extratos enzimáticos brutos do *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* na coagulação do leite, foram aquecidos dois litros de leite pasteurizado a 35°C e em seguida foi adicionado 3 mL de cloreto de cálcio. Após a dissolução do cloreto de cálcio, foram adicionados 10 mL do extrato enzimático bruto de *A. oryzae* ou *A. niger* e efetuou-se a homogeneização das amostras por 1 minuto. O leite ficou em repouso por 12 horas em estufa a 45°C. Após coagulação, com o auxílio de uma faca foram feitos cortes paralelos e cruzados por toda a extensão da massa, com uma distância mínima de três centímetros entre os cortes e a coalhada ficou em repouso por mais cinco minutos, possibilitando a formação do soro. Após o repouso, foi feita a mexedura da massa cortada em movimentos circulares e lentos por toda extensão e profundidade do recipiente. Este processo foi realizado de forma

separada para os extratos enzimáticos de *A. oryzae* e *A. niger*. Como forma de comparação da eficiência de coagulação do leite pelos extratos enzimáticos, o processo de coagulação do leite também foi realizado com um coalho comercial para fabricação de queijo da marca Há-La[®], produzido a partir de *A. niger*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade das proteases de *A. oryzae* e de *A. niger*

O método para determinação da atividade proteolítica que utiliza a azocaseína foi inicialmente desenvolvido por Charney & Tomarelli (1947). A azocaseína é um derivado da caseína, ao qual foi adicionado um grupo sulfonilamida, que tem coloração alaranjada (Figura 1). A hidrólise de uma solução de azocaseína por enzimas proteolíticas resulta na formação de componentes coloridos solúveis, após a precipitação das proteínas não hidrolisadas com ácido tricloroacético.

Nesse estudo, as proteases apresentaram atividade de 203,3 a 304,7 U após 30 min de reação, na temperatura de 55 °C (Tabela 4).

Figura 2 – Imagens dos hidrolisados proteicos utilizando o substrato azocaseína 0,5% e as proteases de *A. oryzae* e de *A. niger*

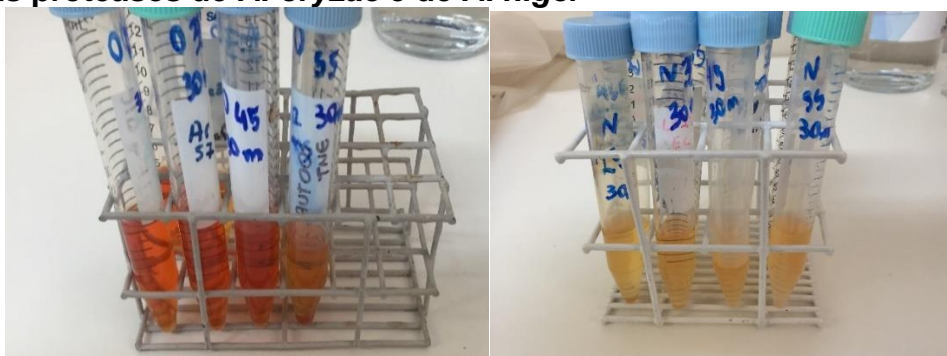


Tabela 4 – Atividade das proteases de *A. oryzae* e de *A. niger* sobre a azocaseína

Substrato da reação	Atividade proteolítica (U)	
	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i>
Azocaseína	203,3	334,7

Condições dos testes: tempo de reação de 30 min e temperatura de 55 °C

Araújo et al. (2020), utilizaram azocaseína 0,5% na determinação da atividade de proteases produzidas por *A. oryzae* NRRL 1911 e obtiveram a atividade máxima de protease de 232,42 U, na temperatura de 55°C, após 40 min de reação. E Lima (2016) utilizou a caseína na determinação da atividade de proteases produzidas por *Aspergillus terreus* e obteve atividade de 84,8 U na temperatura de 50°C, após 10 min de reação.

5.2 Efeito da temperatura na estabilidade enzimática das proteases de *A. oryzae*, *A. niger* e do coalho comercial

A Tabela 5 e os Gráficos 1, 2 e 3 apresentam o efeito da temperatura na estabilidade enzimática das proteases de *A. oryzae*, *A. niger* e do coalho comercial.

Tabela 5 – Efeito da temperatura na atividade das proteases de *A. oryzae*, *A. niger* e do coalho comercial

Temperatura (°C)	Atividade proteolítica (U)				
	<i>A. oryzae</i>		<i>A. niger</i>		Coalho comercial
	30 min	60 min	30 min	60 min	30 min
25	0	69,5	306,7	355,1	60,0
35	46,0	201,4	315,0	354,2	368,5
45	112,5	193,2	297,9	342,1	336,0
55	203,3	289,4	334,7	355,8	369,6

Gráfico 1 – Efeito da temperatura na atividade das proteases de *A. oryzae* em 30 e 60 min de reação

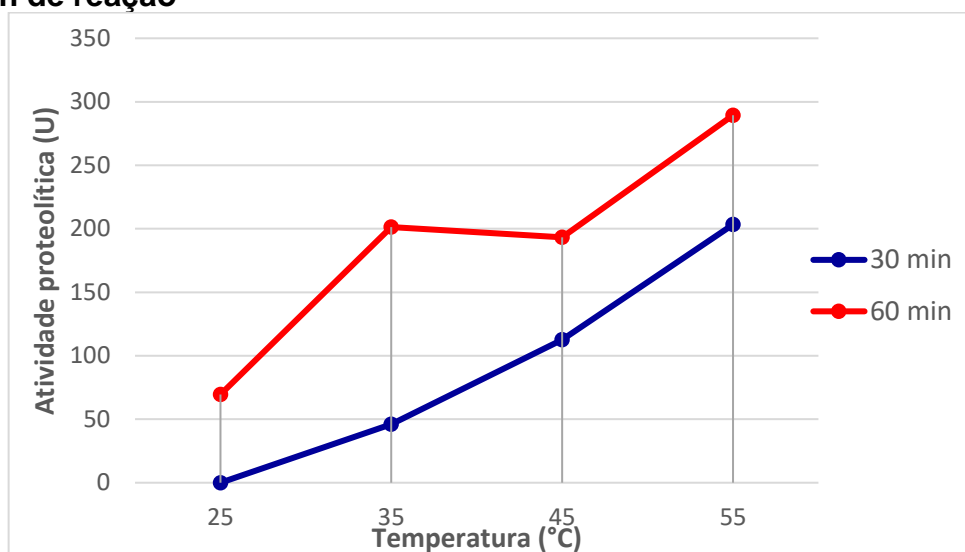


Gráfico 2 – Efeito da temperatura na atividade das proteases de *A. niger* em 30 e 60 min de reação

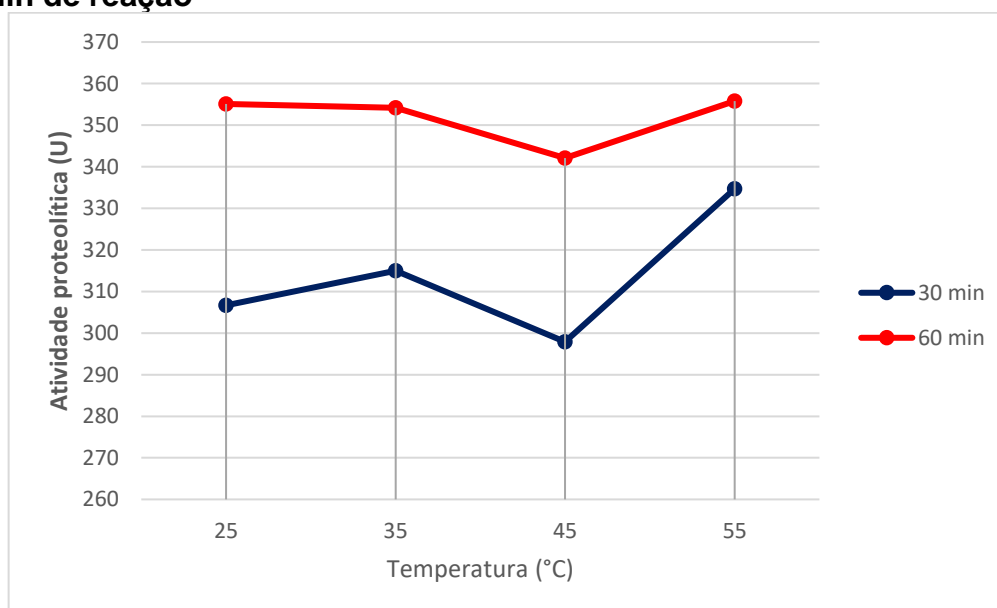
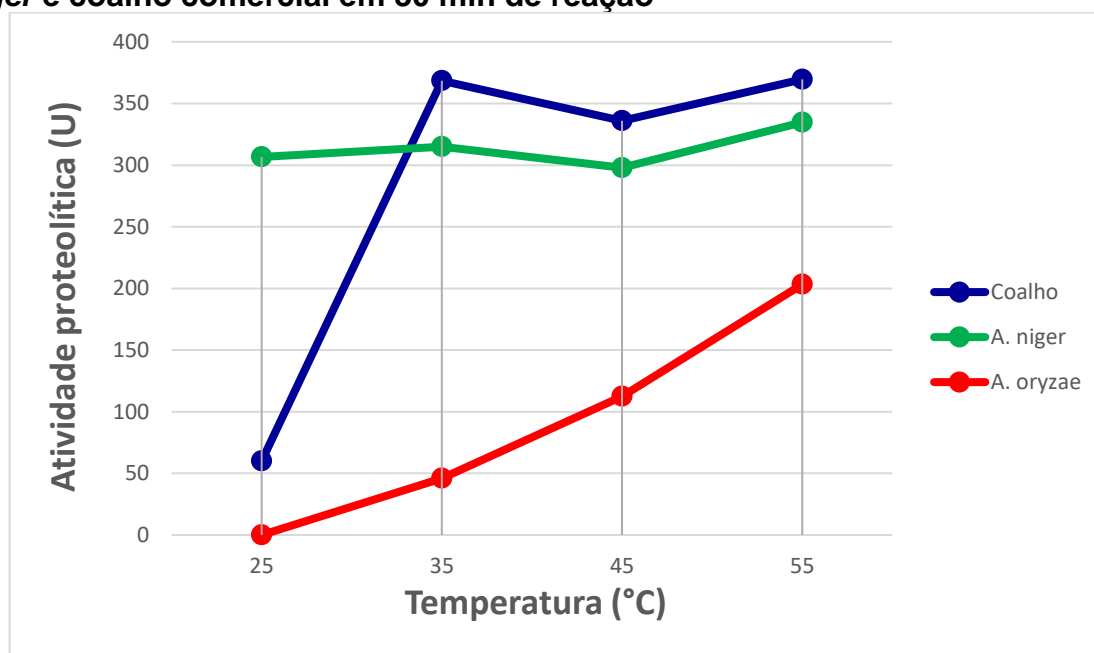


Gráfico 3 - Efeito da temperatura na atividade das proteases de *A. oryzae*, *A. niger* e coalho comercial em 30 min de reação



Observou-se no nosso estudo que as proteases fúngicas de *A. oryzae* e *A. niger* e o coalho comercial apresentaram maior atividade na temperatura de 55°C. Outros estudos na literatura reportaram resultados similares ao nosso estudo. No estudo realizado por Castro e Sato (2014a) foi observada atividade ótima das proteases produzidas por *A. oryzae* LBA 01 na temperatura de 57,2°C e maior atividade nas temperaturas de 50-60°C. Em outro estudo também realizado por Castro et al. (2014), foi observado que as proteases de *A. niger* LBA 02 apresentaram temperatura ótima a 50°C, tiveram maior atividade nas temperaturas de 40-50°C e apresentaram decréscimo na atividade em temperaturas acima de 55°C. No estudo de Araújo et al. (2020), o pico da atividade de proteases produzidas por *A. oryzae* NRRL 1911 foi observado quando se utilizou a temperatura de 55°C, e a partir da temperatura de 60°C a enzima começou a desnaturar, diminuindo a atividade. E Lima (2016) observou que as proteases de *A. terreus* apresentaram atividade ótima entre 50 e 55°C.

5.3 Efeito do pH na estabilidade enzimática das proteases de *A. oryzae* e *A. niger*

A Tabela 6 e os Gráficos 4 e 5 apresentam o efeito do pH na estabilidade enzimática das proteases de *A. oryzae* e *A. niger*.

Tabela 6 – Efeito do pH na atividade das proteases de *A. oryzae* e *A. niger*

pH	Atividade proteolítica (U)	
	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i>
4	71,7	211,2
5	65,9	188,4
6	169,5	147,8
7	154,6	123,6
8	84,4	39,7

Gráfico 4 - Efeito do pH na atividade das proteases de *A. oryzae*

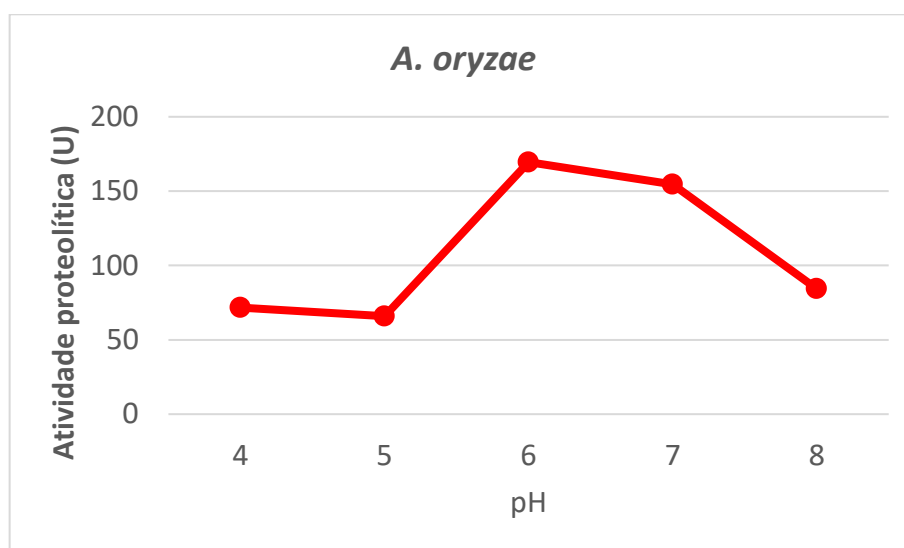
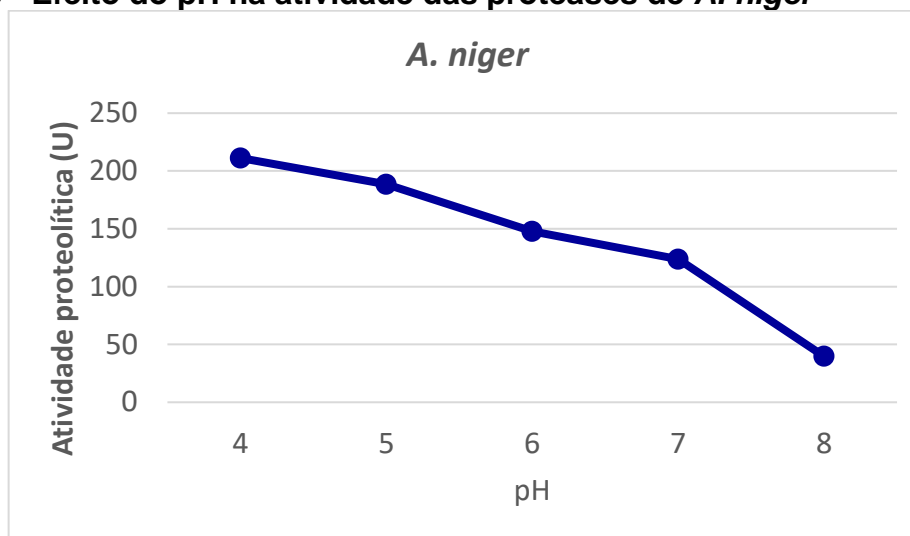


Gráfico 5 - Efeito do pH na atividade das proteases de *A. niger*



A atividade proteolítica máxima do extrato enzimático bruto obtido a partir de *A. oryzae* ocorreu na faixa de pH entre 6,0-7,0, caracterizando proteases neutras. No estudo de Araújo et al. (2020), o pico da atividade de proteases produzidas por *A. oryzae* NRRL 1911 foi em pH 7,0. No estudo realizado por Freitas (2013), as proteases obtidas a partir do *A. oryzae* também obtiveram maior atividade em pH neutro. Ortiz et al. (2016) reportaram que *A. oryzae* ICFC 8/12 apresentou atividade proteolítica máxima na faixa de pH de 6,0 a 6,8, sugerindo que esse extrato era composto principalmente por proteases neutras. Segundo SILVA (2013), *A. oryzae* é a principal fonte de protease neutra fúngica.

O extrato obtido do *A. niger* neste trabalho apresentou uma atividade proteolítica máxima na faixa de pH entre 4,0 e 5,0, caracterizando proteases ácidas. Braaksma et al. (2009) reportaram resultados similares, onde *A. niger* N402 mostrou alta atividade de proteases em pH 4,0-5,0. No estudo de Ortiz et al. (2016), outra espécie de *Aspergillus*, o *A. giganteus* NRRL 10, também exibiu atividade máxima em pH 5,6, indicando um extrato composto principalmente de proteases ácidas.

5.4 Determinação do grau de hidrólise da caseína

A Tabela 7 apresenta o grau de hidrólise da caseína após ação das proteases de *A. oryzae* ou *A. niger*, por 30 min na temperatura de 55°C. O grau de hidrólise (GH) é utilizado para verificar o quanto da proteína foi hidrolisada pelas proteases durante a reação, e é utilizado para monitorar a proteólise e comparar os diferentes

hidrolisados proteicos produzidos. Considerando que a adição de ácido tricloroacético para precipitação e separação das proteínas não hidrolisadas só foi efetiva para a caseína, não ocorrendo precipitação das proteínas não hidrolisadas no caso dos extratos de carne e de levedura e soja, o GH só foi calculado para a caseína, onde a proteína total do sobrenadante (contendo os peptídeos hidrolisados) foi determinada pelo método do Biureto.

Tabela 7 – Grau de hidrólise da caseína após ação das proteases de *A. oryzae* ou *A. niger*

Substratos proteicos	Proteína total (mg)	<i>A. oryzae</i>		<i>A. niger</i>	
		Hidrolisado proteico		Hidrolisado proteico	
		Proteína (mg)	GH (%)	Proteína (mg)	GH (%)
Caseína 0,5%	5,56	1,68	30,21	3,94	70,86

O GH da caseína foi maior quando se utilizou as proteases de *A. niger* (70,86%) em comparação com as proteases de *A. oryzae* (30,21%). Castro e Sato (2014b) obtiveram um hidrolisado proteico a partir de proteína isolada de soja com GH de 23%, após 60 min de reação, usando proteases de *A. oryzae*. No estudo de Dos Santos Aguilar et al. (2018), os hidrolisados de proteína concentrada de arroz apresentaram valores de GH entre 52,45 e 55,83%, após 30 min de reação, utilizando proteases bacterianas.

A hidrólise enzimática seletiva de proteínas sob condições controladas tem sido usada para melhorar a solubilidade, estabilidade, propriedades emulsificantes e espumantes das proteínas. A hidrólise rompe a estrutura terciária da proteína, e assim, reduz seu peso molecular e altera suas propriedades funcionais (LIU et al., 2010). Alguns estudos mostraram que o aumento no GH da proteína aumentou a sua solubilidade. Isso pode ocorrer pelo fato de que a hidrólise enzimática diminui o tamanho da proteína, criando pequenos peptídeos e desdobrando a molécula da proteína, o que leva a grupos mais polares e ionizáveis serem expostos na superfície da proteína. Tais mudanças melhoram a capacidade da proteína de formar ligações de hidrogênio com água e aumentam a sua solubilidade (LIU et al., 2010; INTARASIRISAWAT et al., 2012).

5.5 Determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos pelos métodos de ABTS e DPPH

As Tabelas 8 e 9 apresentam as atividades antioxidantes dos hidrolisados proteicos pelos métodos de ABTS e DPPH.

Tabela 8 – Atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos pelo método de ABTS

Hidrolisados proteicos	ABTS			
	(Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)		(% de descoloração de radicais)	
	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i>
Extrato de carne 1%	625,14 ^a	586,85 ^b	75,42 ^c	65,14 ^d
Extrato de levedura 1%	566,85 ^a	549,71 ^b	63,14 ^c	61,42 ^d
Caseína 0,5%	1336,00 ^a	1096,56 ^b	79,71 ^c	61,28 ^d
Soja moída 1%	502,28 ^a	634,00 ^b	63,14 ^c	69,85 ^d

As médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes a $p < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey.

Tabela 9 – Atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos pelo método de DPPH

Hidrolisados proteicos	DPPH			
	(Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)		(% de descoloração de radicais)	
	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i>
Extrato de carne 1%	486,28 ^a	703,42 ^b	44,88 ^c	61,77 ^d
Extrato de levedura 1%	357,85 ^a	656,28 ^b	34,88 ^c	58,11 ^d
Caseína 0,5%	1061,14 ^a	1301,14 ^b	48,33 ^c	57,67 ^d
Soja moída 1%	543,42 ^a	680,57 ^b	49,33 ^c	60,00 ^d

As médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes a $p < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey.

Neste estudo, os hidrolisados de caseína produzidos tanto por *A. oryzae* quanto por *A. niger* apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante nos métodos de ABTS (1096,5 - 1336,00 Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) e DPPH (1061,14-1301,14 Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$). Esperança et al. (2020) reportaram valores de atividade antioxidante de 3.876,34 a 5.254,23 Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ para o hidrolisado de clara de ovo em pó, pelo método do ABTS, utilizando proteases comerciais (papaína, pepsina e alcalase). As

proteases comerciais são mais purificadas e por isso, no geral, apresentam maior grau de hidrólise das proteínas, podendo justificar a maior atividade antioxidante.

Os hidrolisados de extrato de carne, extrato de levedura e proteína de soja deste estudo apresentaram valores de atividade antioxidante variando de 502,28 a 634,00 Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ no método de ABTS e de 357,85 a 703,42 Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ no método de DPPH. No estudo de Castro e Sato (2014a), a hidrólise enzimática de proteína isolada de soja, proteína de soro de leite bovino e proteína de clara de ovo realizada por extrato enzimático bruto de *A. oryzae* LBA 01 resultou em valores máximos de atividade antioxidante de 645,20, 172,11 e 469,65 Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente, determinada pelo método de DPPH.

Castro & Sato (2014b), obtiveram o valor de atividade antioxidante de 645,20 Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ para o hidrolisado de proteína de soja realizado por proteases de extrato enzimático bruto de *A. oryzae* LBA 01, através do método de ORAC. Segundo os autores, as diferenças na combinação enzima-substrato são responsáveis por diferentes atividades antioxidantes das proteínas hidrolisadas. Essas diferenças podem ser atribuídas à especificidade dessas enzimas em proteínas, liberando peptídeos com diferentes tamanhos, sequências de aminoácidos e atividade antioxidante.

5.6 Aplicação dos extratos enzimáticos brutos do *A. oryzae* e *A. niger* na coagulação do leite

Os resultados da coagulação do leite, utilizando os extratos enzimáticos de *A. oryzae* e *A. niger* e a produção do controle positivo realizado com um coalho comercial pode ser observada nas figuras 3, 4 e 5. Ambos os extratos enzimáticos possuíram capacidade de coagulação do leite, havendo separação entre o soro do leite e a massa coagulada.

Figura 3 – Coagulação do leite com uso do extrato enzimático bruto de *A. oryzae*



Figura 4 – Coagulação do leite com uso do extrato enzimático bruto de *A. niger*



Figura 5 – Coagulação do leite com uso do coalho comercial HÁ-LA®



6 CONCLUSÃO

O presente trabalho de pesquisa estudou a produção e aplicação de proteases com o uso dos fungos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*. As proteases produzidas por *A. oryzae* e *A. niger* mostraram uma maior atividade em temperaturas entre 50 e 60°C. O extrato enzimático bruto obtido a partir do *A. niger* mostrou uma atividade proteolítica máxima em pH ácido (pH 4,0) e para o *A. oryzae* a maior atividade proteolítica foi obtida em pH neutro (pH 7,0). Verificou-se que os hidrolisados de caseína, de extrato de carne, de extrato de levedura e de proteína de soja apresentaram atividade antioxidante. Portanto, as proteases de *A. oryzae* e *A. niger* produzem peptídeos bioativos com atividade antioxidante *in vitro*, e esses hidrolisados proteicos podem ser usados em várias aplicações industriais e biotecnológicas.

REFERENCIAS

ARAÚJO, F. S.; SOUZA, I. H. S.; FREITAS, A. C. Estudo das condições de pH e temperatura para máxima atividade de protease de *Aspergillus oryzae* NRRL 1911. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 1, p.3077- 3091, 2020.

BRAAKSMA, M. et al. The effect of environmental conditions on extracellular protease activity in controlled fermentations of *Aspergillus niger*. **Microbiology**, p. 3430-3439, 2009.

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

CARREIRA, R. L.; SILVA, V. D. M.; LIMA, L. G.; MORAIS, H. A.; SILVESTRE, M. P. C. Perfil peptídico de hidrolisados proteicos da farinha de trigo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 4, p. 481–489, 2011.

CASTRO, R. J. S.; BAGAGLI, M. P.; SATO, H. H. Improving the functional properties of milk proteins: focus on the specificities of proteolytic enzymes. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p.64–69, 2015.

CASTRO, R. J. S. SATO, H. H. Protease from *Aspergillus oryzae*: biochemical characterization and application as a potential biocatalyst for production of protein hydrolysates with antioxidant activities. **Journal of Food Processing**, p. 1-11, 2014a.

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

CASTRO, R. J. S. OHARA, A. NISHIDE, T. G. ALBERNAZ, J. R. M. SOARES, M. H. SATO, H. H. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on

the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2014.

CASTRO, R. J. S. **Production, biochemical characterization of a protease from *Aspergillus oryzae* and its application to protein hydrolysis for obtaining hydrolysates with antioxidant activity.** Tese (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 80 p., 2012.

CHARNEY, M.S.; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v.171, p.501-505, 1947.

CORRÊA, A. P. F. **Obtenção de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de caseinato ovino e soro de queijo ovino.** Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90 p., 2013.

DOS SANTOS AGUILAR, J. G.; DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Optimization of the enzymatic hydrolysis of rice protein by different enzymes using the response surface methodology. **3 Biotech**, v. 8, n. 8, p. 372, 2018.

DOS SANTOS, S. D. *et al.* Otimização dos parâmetros de produção de hidrolisados proteicos enzimáticos utilizando pescado de baixo valor comercial. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 72-77, 2009.

ESPERANÇA, V. J. R., *et al.* Effects of heat pretreatment on the yield and bioactivity of powdered egg whites hydrolysates by three different proteases. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 31493-31511, 2020.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biureto reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.

FREITAS, A. C. **Produção de extrato enzimático proteolítico por *Aspergillus oryzae* CCBP001 em reator instrumentado por fermentação semi-sólida.** Tese (Doutorado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 115 p., 2013.

INTARASIRISAWAT, R. *et al.* Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonus pelamis*) roe. **Food Chemistry**, v. 135, p. 3039–3048, 2012.

KRIJGSHELD, P. *et al.* Development in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 74, pp. 1-29, 2012.

LIMA, E. E. **Produção, caracterização bioquímica de proteases produzida por fungos filamentosos e aplicação biotecnológica.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2016.

LIU, Q. *et al.* Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 118, p. 403–410, 2010.

MILANEZI, N. G. **Purificação e caracterização de uma endo-1,4- β -xilanase produzida por *Aspergillus niger* com características de interesse industrial.** 2010. xii, 82 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular), Universidade Brasília, Brasília, 94 p., 2010.

MOITA, S. R. **Peptídeos biologicamente ativos extraídos de diferentes tipos de queijos e avaliados por meio de espectrometria de massas.** Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 43 p., 2011.

MONCLARO, A. V. **Caracterização de múltiplas formas de xilanases produzidas por *Aspergillus oryzae* quando crescido em resíduos têxteis.** 110 p. Tese (Mestrado em Biologia Molecular), Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

OLIVEIRA, M. S. R. et al. Utilização de enzimas proteolíticas para produção de hidrolisados proteicos a partir de carcaças de frango desossadas manualmente. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 3, p. 199-210, 2015.

OLIVEIRA FILHO, J. G. **Obtenção de peptídeos bioativos a partir de subproduto do algodão para aplicação em filmes ativos e biodegradáveis**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica), Instituto Federal Goiano, Campus do Rio Verde, 2018.

ORTIZ, G. E. et al. A comparative study of new *Aspergillus* strains for proteolytic enzymes production by solid state fermentation. **Enzyme Research**, p. 1-11, 2016.

PACHECO, B. et al. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados proteicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, n. 2, p. 333-338, 2005.

PEREIRA, J. L. **Produção de enzimas amilolíticas por *Aspergillus oryzae* através de fermentação no estado sólido**. Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, 56 p., 2014.

RUFINO, M. do S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Comunicado Técnico**, Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007a.

RUFINO, M. do S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico**, Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007b.

SHUSTER, E., DUNN-COLEMAN, N., FRISVAD, J.C., VAN DIJCK, P.W.M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p. 426–435, 2002.

SILVA, E. T. **Estabilização de proteases para aplicação tecnológica**. Tese (Mestrado), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 68 p., 2013.

SILVA, M. R. **Obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico do soro de leite com alto teor de oligopeptídeos e elevada atividade inibitória sobre a enzima conservadora de angiotensina, utilizando a pancreatina e a papaína.** Tese (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 89 p., 2010.

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

SUMANTHA, A., LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food grade proteases - a perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n.2, p. 211–220, 2006.

TAVANO, O. L, *et al.* Biotechnological applications of proteases in food technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, p. 412-436, 2018.

VISHWANATHA, K. S., RAO, A. G., SINGH, S. A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 129-138, 2010.

ANEXO 1 – Determinação de proteína pelo método de biureto

PREPARO DO REAGENTE DE BIURETO

- Dissolver 1,5 g de sulfato cúprico e 6,0 g de tartarato de sódio e potássio em 500 mL de água destilada.
- Com agitação constante, adicione 300 mL de solução de NaOH 10%.
- Dilua até 1000 mL com água.
- O reagente pode ser guardado indefinidamente em garrafa de polietileno (não deve ser vidro, pois o vidro é atacado por álcalis), mas deve ser descartado caso apareça um precipitado preto-avermelhado.

CURVA PADRÃO DE CASEÍNA

- Pesar 0,5 g de caseína.
- Transferir para um béquer pequeno, adicionar 20 mL de água destilada e 1,0 mL de NaOH 0,5 N.
- Esquentar em chapa elétrica rapidamente para solubilizar a proteína (não exceder 3 min no aquecimento).
- Transferir para um balão volumétrico de 50 mL e completar com água (filtrar se for preciso para retirar os insolúveis).
- Adicionar em tubos de ensaio previamente enumerados alíquotas de 0,0 – 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 – 1,0 mL do padrão albumina.
- Adicionar, respectivamente: 1,0 – 0,8 – 0,6 – 0,4 – 0,2 – 0,0 mL de água destilada.
- Adicionar 4,0 mL do reagente de biureto em cada tubo. **Agitar os tubos.**
- Deixar 30 minutos em repouso e ler a absorbância a 540 nm.

Curva Padrão de caseína obtida neste estudo – MÉTODO DE BIURETO

500 mg de caseína — — — 50 mL



X ————— 0,2 mL (2 mg)
 0,4 mL (4 mg)
 0,6 mL (6 mg)
 0,8 mL (8 mg)
 1,0 mL (10 mg)

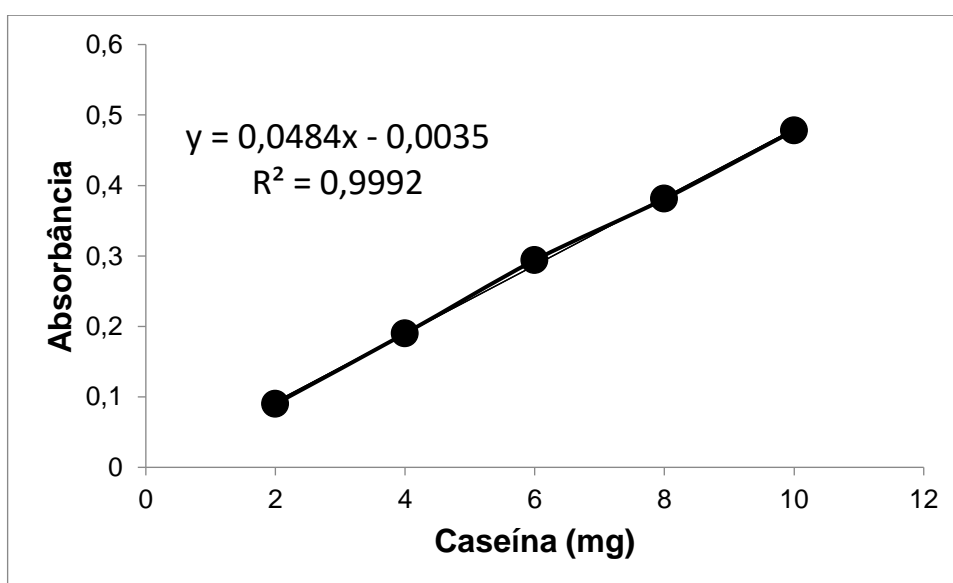
Ex:

500 mg — — — 50 mL

x — — — 0,2 mL

$x = 2$ mg

Caseína (mg)	Absorbância
2	0,090
4	0,190
6	0,294
8	0,381
10	0,478



Proteínas	Proteína total		<i>A. oryzae</i> Hidrolisado		<i>A. niger</i> Hidrolisado	
	ABS	(mg)	ABS	(mg)	ABS	(mg)
Extrato de carne 1%	0,237	4,97	0,359	7,34	0,305	6,23
Extrato de levedura 1%	0,231	4,70	-	-	0,347	7,09
Caseína 0,5%	0,275	5,56	0,085	1,68	0,195	3,94

Cálculo de proteína total da caseína

$$y = 0,0484x - 0,0035$$

$$0,275 = 0,0484x - 0,0035$$

$$X = 5,56 \text{ mg}$$

Cálculo do hidrolisado de caseína de *A. oryzae*

$$\%GH = \frac{\text{proteínas hidrolisadas}}{\text{proteína total da amostra}} \times 100$$

$$\%GH = \frac{1,68}{5,56} \times 100 = 30,21\%$$

Para extrato de carne e de levedura

hidrolisado - Proteína total = proteína hidrolisada

$$7,34 - 4,97 = 2,37$$

Proteínas	Proteína total	<i>A. oryzae</i> Hidrolisado		<i>A. niger</i> Hidrolisado	
	(mg)	(mg)	%GH	(mg)	%GH
Extrato de carne 1%	4,97	2,37	47,69	1,26	25,35
Extrato de levedura 1%	4,70	-	-	2,39	50,85
Caseína 0,5%	5,56	1,68	30,21	3,94	70,86

ANEXO 2 – Tabelas de determinação de pH de estabilidade e temperatura ótima das proteases

ABSORBANCIA DO CONTROLE de azocaseína = 4,0

pH	Atividade proteolítica			
	<i>A. oryzae</i>		<i>A. niger</i>	
	ABS	(U)	ABS	(U)
4	3,283	71,7	1,888	211,2
5	3,341	65,9	2,116	188,4
6	2,305	169,5	2,522	147,8
7	2,458	154,6	2,768	123,6
8	3,156	84,4	3,603	39,7

Temperatura (°C)	Atividade proteolítica									
	<i>A. oryzae</i>				<i>A. niger</i>				Coalho	
	30 min		60 min		30 min		60 min		30 min	
	ABS	(U)	ABS	(U)	ABS	(U)	ABS	(U)	ABS	(U)
25	4,000	0	3,305	69,5	0,933	306,7	0,449	355,1	3,400	60,0
35	3,540	46,0	1,986	201,4	0,850	315,0	0,458	354,2	0,314	368,5
45	2,875	112,5	2,068	193,2	1,021	297,9	0,579	342,1	0,640	336,0
55	1,967	203,3	1,106	289,4	0,653	334,7	0,442	355,8	0,304	369,6

Uma unidade de atividade proteolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de 0,01 na absorbância entre o controle e a amostra.

Cálculo de atividade

Abs controle – abs amostra

Ex: 4,0 – 3,305 = 0,695

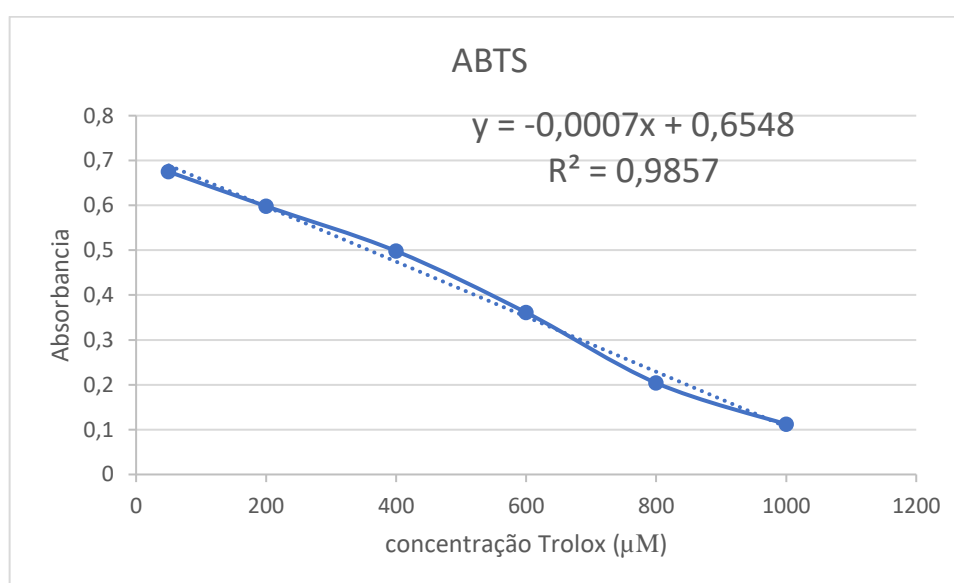
0,695 ----- 0,01 U

X ----- 1 U

X = 69,5 U

ANEXO 3 – Curva padrão de ABTS - Concentração Trolox (μM)

	Absorbância	Concentração Trolox (μM)
1	0,675	50
2	0,598	200
3	0,498	400
4	0,361	600
5	0,204	800
6	0,112	1000



Para elaboração da curva padrão de Trolox, o reagente foi diluído para obter as seguintes concentrações: 50, 200, 400, 600, 800 e 1000 μM . Então, transferiu-se uma alíquota de 20 μL de cada diluição do Trolox para tubos de ensaio contendo 980 μL da solução do radical ABTS. A leitura foi realizada após 6 min a 734 nm, usando álcool etílico como branco.

Para o preparo da solução do radical ABTS, pesou-se 0,192 g de ABTS, dissolveu em água destilada e completou o volume para 50 mL em balão volumétrico (solução estoque de ABTS). A solução do radical ABTS é preparada pipetando-se 5 mL da solução estoque de ABTS e 88 μL da solução de persulfato de potássio. Manter a mistura no escuro, a temperatura ambiente, por 16 h. Então diluir em etanol para obter 0,700 a 734 nm (4 mL do ABTS em 10 mL de etanol).

ANEXO 4 – Teste ABTS para os hidrolisados proteicos - Trolox EQ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$

Hidrolisados proteicos	<i>A. oryzae</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. oryzae</i> (1:2)	
	Abs	Atv ant	Abs	Atv ant	Abs	Atv ant
Extrato de carne 1%	0,051	---	0,244	586,85	0,436	625,14
Extrato de levedura 1%	0,258	566,85	0,270	549,71	--	--
Caseína 0,5%	0,035	---	0,271	1096,56	0,421	1336,00
Soja moída 1%	0,160	706,85	0,211	634,00	0,479	502,28

$$Y = - 0,0007x + 0,6548$$

$$0,270 = - 0,0007x + 0,6548$$

$$0,0007x = 0,6548 - 0,270$$

$$X = 549,71 \mu\text{mol de Trolox equivalente}\cdot\text{g}^{-1} \text{ de hidrolisado proteico (Trolox EQ } \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{)}$$

Resultados para a caseína (0,5%):

$$548,28 \text{ ---- } 0,5 \text{ g de caseína}$$

$$X \text{ ---- } 1 \text{ g}$$

$$X = 1096,56 \text{ Trolox EQ } \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$$

Resultados para *A. oryzae* (1:2)

$$Y = - 0,0007x + 0,6548$$

$$0,436 = - 0,0007x + 0,6548$$

$$0,0007x = 0,6548 - 0,436$$

$$X = 312,57 \text{ Trolox EQ } \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$$

Cálculo de diluição:

$$312,57 \times 2 = 625,14 \text{ Trolox EQ } \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$$

ANEXO 5 – Teste ABTS para os hidrolisados proteicos - % descoloração

Atividade de descoloração de radicais (%) = $\frac{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100$

Absorbância do controle = 0,700

Ex. de cálculo:

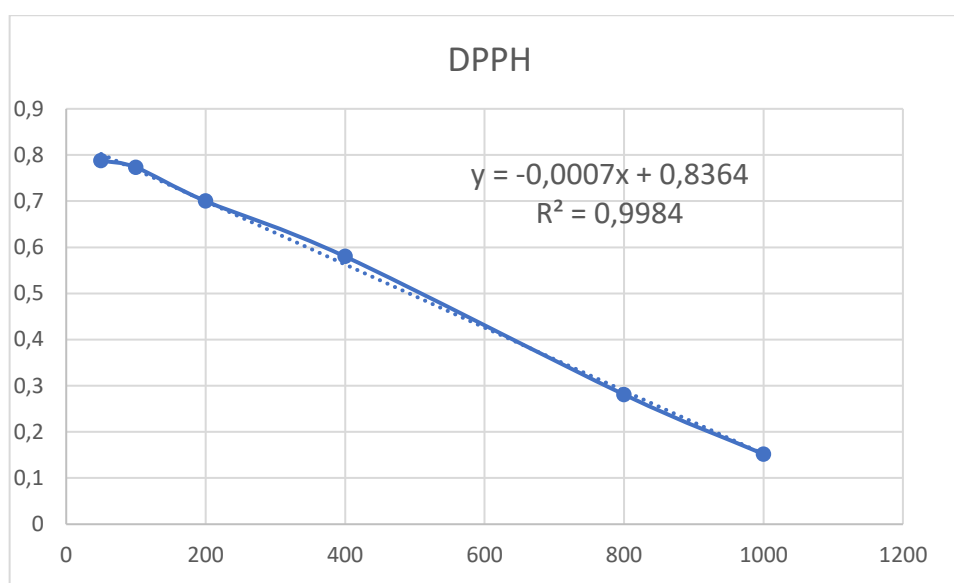
$$0,700 - 0,258 = 0,442$$

$$0,442/0,700 = 0,6314 \times 100 = 63,14\%$$

Hidrolisados proteicos	<i>A. oryzae</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. oryzae</i> (1:2)	
	Abs	%	Abs	%	Abs	%
Extrato de carne 1%	0,051	---	0,244	65,14	0,436	75,42
Extrato de levedura 1%	0,258	63,14	0,270	61,42	--	--
Caseína 0,5%	0,035	---	0,271	61,28	0,421	79,71
Soja moída 1%	0,160	77,14	0,211	69,85	0,479	63,14

ANEXO 6 – Curva padrão de DPPH

	Absorbância	Concentração Trolox (μM)
1	0,788	50
2	0,773	100
3	0,700	200
4	0,580	400
5	0,281	800
6	0,152	1000



Solução de DPPH (80 μM ou 0,8 mM): 0,032 g de DPPH em 1 litro etanol ou 0,016 g de DPPH em 500 mL de etanol (pode ser metanol).

Verificar a absorbância da solução de DPPH a 517 nm, que deve estar entre 0,9-1,1.

Para curva padrão pipetar 3,9 mL de DPPH e 0,1 mL das soluções diluídas do trolox. Colocar em repouso por 30 min na caixa de isopor. Fazer leituras em 517 nm.

ANEXO 7 – Teste DPPH para os hidrolisados proteicos

Hidrolisados proteicos	<i>A. oryzae</i>		<i>A. niger</i>	
	Abs	Atv ant	Abs	Atv ant
Extrato de carne 1%	0,496	486,28	0,344	703,42
Extrato de levedura 1%	0,586	357,85	0,377	656,28
Caseína 0,5%	0,465	530,57	0,381	650,57
Soja moída 1%	0,456	543,42	0,360	680,57

$$Y = - 0,0007x + 0,8364$$

$$0,496 = - 0,0007x + 0,8364$$

$$0,0007x = 0,8365 - 0,496$$

$$X = 486,43 \mu\text{mol de Trolox equivalente} \cdot \text{g}^{-1} \text{ de hidrolisado proteico (Trolox EQ } \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$$

ANEXO 8 – Teste DPPH para os hidrolisados proteicos - % descoloração

Atividade de descoloração de radicais (%) = $\frac{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100$

Absorbância do controle = 0,900

Ex. de cálculo:

$$0,900 - 0,496 = 0,404$$

$$0,404/0,900 = 0,4488 \times 100 = 44,88\%$$

Hidrolisados proteicos	<i>A. oryzae</i>		<i>A. niger</i>	
	Abs	%	Abs	%
Extrato de carne 1%	0,496	44,88	0,344	61,77
Extrato de levedura 1%	0,586	34,88	0,377	58,11
Caseína 0,5%	0,465	48,33	0,381	57,67
Soja moída 1%	0,456	49,33	0,360	60,00