



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PPG CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**PEPTÍDEOS BIOATIVOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE DE PROTEÍNA DE SORO DE
LEITE BOVINO MEDIADA POR PROTEASES DE *Lysobacter* sp. A03**

Dissertação de Mestrado

Gersi Cristina Lunar Millan

Porto Alegre

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PPG CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Gersi Cristina Lunar Millan

Dissertação apresentada como um dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Porto Alegre

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PPG CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CIP - Catalogação na Publicação

Millán, Gersi Cristina Lunar
PEPTÍDEOS BIOATIVOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE DE
PROTEÍNA DE SORO DE LEITE BOVINO MEDIADA POR PROTEASES
DE *Lysobacter* sp. A03 / Gersi Cristina Lunar Millán.
-- 2021.
62 f.
Orientador: Adriano Brandelli.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Soro de leite. 2. Hidrolise de proteína . 3.
Proteases microbianas psicrotolerantes . 4. Peptídeos
bioativos . I. Brandelli, Adriano, orient. II.
Titulo.

AGRADECIMENTOS

A minha lutadora inalcançável minha mãe

A meus irmãos minha inspiração

A meu marido meu apoio incondicional

A minha família brasileira: Luisafernanda, Ana, Carmela, Zulmar, Adalia, Anelise, Luiz Antonio, Tiago, Boris e a Nina.

Ao meu orientador Professor Adriano Brandelli por abrir as portas do lab. 218 para mim, acreditar em mim e pela oportunidade. Obrigada Professor!

Ao coordenador do PPGCTA Professor Eliseu Rodrigues pelo acompanhamento em minha chegada no Brasil

Ao secretario do PPGCTA Fernando por sua amabilidade em cada dúvida e procedimento

A Priscilla e a Luana pelo apoio para o uso dos equipamentos

A turma mais maravilhosa que se possa ter: Raquel, Natalia, Matheus, Carol e Adriana

A meus colegas do lab. 218: Paolo, Flavio, Henrique, Cristian e a Maria.

A minha amiga Palmira Penina. Obrigada por tudo menina!

A meus Professores do PPGCTA por tudo o que aprendi de vocês. Obrigada!

Infinitas gracias!

PEPTÍDEOS BIOATIVOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE BOVINO MEDIADA POR PROTEASES DE *Lysobacter* sp. A03

Gersi Cristina Lunar Millán

Orientador: Adriano Brandelli

Resumo

Diversas atividades biológicas tem sido relacionadas a peptídeos derivados de proteínas alimentares. Por meio da hidrólise proteica mediada por enzimas proteolíticas, essas sequências criptografadas dentro da sequência peptídica, podem ser liberadas em sequências mais curtas e exercer diversas atividades biológicas que podem ser úteis na conservação de alimentos e como compostos nutracêuticos. Neste estudo, hidrolisados de soro de leite bovino foram obtidos utilizando proteases de *Lysobacter* sp. A03, um microrganismo psicrotolerante da Antártida isolado de penas de pinguim. A partir dos hidrolisados obtidos, foram estudadas diferentes atividades biológicas como a atividade antioxidante pelos métodos ABTS (radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), TBARS e capacidade quelante de ferro (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), a atividade anti-hipertensiva (inibição da enzima conversora de angiotensina-I (ECA)) e atividade antimicrobiana contra as bactérias *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* sv. Enteritidis e *Escherichia coli*. Os hidrolisados de soro de leite obtidos no tempo de 4 horas duplicaram suas atividades de ABTS e DPPH, alcançando valores de $46,60 \pm 0,75\%$ e $11,20 \pm 1,37\%$, respectivamente. A capacidade quelante de ferro foi elevada para o soro não hidrolisado $69,10 \pm 0,65\%$ não havendo aumento significativas ao longo do tempo de hidrólise, sendo o valor mais alto obtido de $70,78 \pm 0,09\%$ em 3 h. Os valores de TBARS também foram similares, não ocorrendo aumento ao longo do tempo de hidrólise. Na atividade de inibição da ECA, houve um aumento significativo da atividade inicial (soro não hidrolisado), sendo o hidrolisado obtido em 2 h que apresentou maior inibição $91,16 \pm 6,69\%$. Para a atividade antimicrobiana, não foi verificada atividade nos hidrolisados contra as cepas bacterianas estudadas. Os resultados do estudo indicam o potencial de proteases de *Lysobacter* A03 para produção de hidrolisados proteicos com atividade antioxidante e anti-hipertensiva.

Palabras chaves: Soro de leite; protease microbiana psicrotolerante; hidrolisado de proteína; peptídeo bioativo; atividade antioxidante; atividade anti-hipertensiva

BIOACTIVE PEPTIDES OBTAINED BY HYDROLYSIS OF BOVINE WHEY PROTEINS USING *Lysobacter* sp A03 PROTEASES

Gersi Cristina Lunar Millán

Orientador: Adriano Brandelli

ABSTRACT

Several biological activities have been related to peptides derived from food proteins. Through protein hydrolysis mediated by proteolytic enzymes, these sequences, encrypted within the peptide sequence, can be released in shorter sequences, and exert several biological activities that can be useful in food preservation and as nutraceutical compounds. In this study, bovine whey hydrolysates were selected using proteases from *Lysobacter* sp. A03, a psychrotolerant microorganism from Antarctica isolated from penguin feathers. From the hydrolysates, different biological activities were studied such as the antioxidant activity by ABTS (radical 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl), TBARS and iron chelating capacity (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), an antihypertensive activity (inhibition of the angiotensin-I-converting enzyme (ACE)) and antimicrobial activity against the bacteria *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* sv. *Enteritidis* and *Escherichia coli*. The whey hydrolysates after 4 hours doubled their ABTS and DPPH activities, reaching values of $46.60 \pm 0.75\%$ and $11.20 \pm 1.37\%$, respectively. The iron chelating capacity was high for non-hydrolyzed serum $69.10 \pm 0.65\%$, with no significant increase over the hydrolysis time, the highest value being $70.78 \pm 0.09\%$ in 3 h. TBARS values were also similar, with no increase over the hydrolysis time. In the activity of ACE inhibition, there was a significant increase in the initial activity (non-hydrolyzed serum), with the hydrolysate recorded in 2 h which presented greater inhibition $91.16 \pm 6.69\%$. For the antimicrobial activity, the hydrolysates did not present any activity against the bacterial strains studied. The results of the study indicate the potential of *Lysobacter* A03 proteases to produce protein hydrolysates with antioxidant and antihypertensive activity.

Keywords: whey; psychrotolerant microbial protease; protein hydrolysate; bioactive peptide; antioxidant activity; antihypertensive activity

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1.1	Objetivo geral	14
2.1.2	Objetivos específicos	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	Soro de leite	16
3.2	Proteases microbianas.....	17
3.3	Proteases produzidas por microrganismos adaptados al frio	18
3.4	<i>Lysobacter</i> sp A03.....	19
3.5	Peptídeos Bioativos.....	19
3.6	Peptídeos antioxidantes	20
3.7	Peptídeos Antimicrobianos.....	22
3.8	Peptídeos Antihipertensivos	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5	REFERENCIAS	49
6	ANEXOS	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade antioxidante dos hidrolisados do soro de leite.....	34
Tabela 2. Atividade ABTS das frações purificadas em coluna Sephadex G-10 com maior atividade de hidrolisado do soro de leite bovino com A03.....	41
Tabela 3. Valores de massas e relação m/z em cada pico da amostra do soro de leite 2 horas por espectrometria de massas.....	42
Tabela 4. Parâmetros frequência de ocorrência (A_E) e grau de hidrólise teórico (GH%) arrojados pela base de dados BIOPEP.....	46

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Grau de hidrólise (%) de hidrolisado obtidos de soro de leite obtidos com proteases de A03.....33
- Figura 2.** Atividade anti-hipertensiva (% inibição ECA) obtidos em hidrolisados de soro de leite bovino tratados com proteases de A03.....39
- Figura 3.** Perfil de eluição em coluna Sephadex G-10 dos hidrolisados liofilizados de soro de leite bovino no tempo 2 horas.....40
- Figura 4.** Cromatograma do hidrolisado de soro de leite bovino no tempo 2 horas purificado em coluna Sephadex G-10 da coleta 4, obtido por UPLC usando coluna C18.....41
- Figura 5.** Resultados da simulação da hidrólise in silico pela base de dados BIOPEP-UWM (fragmentação da β -lactoglobulina e peptídeos bioativos)45

1 INTRODUÇÃO

Existe um crescente interesse no estudo de peptídeos bioativos, os quais são compostos de sequências curtas de aproximadamente 2-20 aminoácidos geradas por hidrólise enzimática ou química, que tem a capacidade de produzir efeitos benéficos sobre a saúde. Estes peptídeos se encontram formando parte da sequência do polipeptídeo nativo dentro das proteínas em alimentos, nos quais não apresentam atividade biológica e são inativos. Os peptídeos são liberados por hidrólise podendo aportar benefícios para a saúde por certas propriedades biológicas como atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-hipertensiva, entre outras.

A obtenção destes peptídeos pode ser feita por enzimas proteolíticas derivadas de diferentes fontes como animal, vegetal e microbiana. As enzimas de origem microbiana são as mais utilizadas por seu maior rendimento, sendo economicamente mais vantajoso, além de sua ampla diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética. As proteases microbianas têm sido utilizadas como biocatalizadores para a produção de hidrolisados de proteínas.

Nos últimos anos diversos estudos têm demonstrado as vantagens de usar enzimas isoladas de microrganismos que habitam ambientes de temperaturas baixas como as regiões polares, as profundidades dos oceanos e altas altitudes (CAVICCHIOLI, 2016). Recentemente pesquisas com a cepa psicrotolerante *Lysobacter* sp. A03, isolada de penas de pinguim na Antártida, demonstraram sua capacidade proteolítica. Esta cepa é capaz de produzir uma grande variedade de enzimas proteolíticas, apresentando atividades caseinolítica e queratinolítica em extratos enzimáticos nas temperaturas máximas entre 15 e 20 °C (PEREIRA et al., 2015).

Algumas das fontes mais utilizadas para a produção de hidrolisados e obtenção de peptídeos bioativos, são proteínas derivadas do leite como as caseínas e proteínas do soro. Estas proteínas podem ser hidrolisadas por diversas proteases, gerando peptídeos, os quais podem desenvolver uma série de atividades fisiológicas, como eliminação de radicais livres, complexação de íons metálicos, redução de pressão arterial, atividade antimicrobiana, antifúngica, entre outras.

O soro corresponde à fração líquida que resulta da coagulação e eliminação da caseína durante a fabricação de queijo. Este subproduto no passado era visto como um contaminante, mas com o tempo, novas pesquisas e inovações tem revelado suas propriedades funcionais e bioativas. A partir deste subproduto e o uso de várias enzimas proteolíticas é possível obter uma diversidade de hidrolisados bioativos (BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015). Algumas evidências sustentam a teoria de que as proteínas do leite, incluindo as proteínas do soro, além de seu alto valor biológico, possuem peptídeos bioativos, que atuam como agentes antimicrobianos, anti-hipertensivos, reguladores da função imune, assim como fatores de crescimento. Assim, o soro do leite bovino é uma excelente fonte para produção de hidrolisados proteicos com possibilidade de aplicação como ingredientes funcionais (ANTUNES, 2003).

São necessárias pesquisas mais detalhadas para fornecer um melhor conhecimento sobre o soro, e a necessidade de encontrar novas fontes proteolíticas, pois a maioria dos estudos usa proteases convencionais. Até o momento existem poucos estudos relacionados com a obtenção de enzimas proteolíticas de microrganismos psicrotolerantes como *Lysobacter* sp. A03 a partir de soro de leite, convertendo-se em uma necessidade para obtenção de novas fontes enzimáticas biotecnologicamente relevantes e outros compostos de grande importância.

Os resultados obtidos do presente trabalho fornecem novas informações para direcionar futuros estudos sobre peptídeos com atividades biológicas, que trazem grande potencial para a conservação de alimentos e na saúde, assim como também o estudo de novas enzimas proteolíticas, produzidas por bactérias psicrotolerantes como a *Lysobacter* sp. A03, que podem ter impacto para o desenvolvimento de novas pesquisas e obtenção produtos de grande benefício.

2 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo geral

Estudar a atividade biológica dos peptídeos obtidos através da hidrólise de proteína de soro de leite bovino pela ação da bactéria *Lysobacter* sp. A03.

2.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os peptídeos obtidos a partir da hidrólise enzimática da proteína do soro do leite bovino;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos peptídeos obtidos por hidrólise de proteína;
- Determinar a capacidade antimicrobiana dos peptídeos obtidos por hidrólise;
- Determinar a capacidade anti-hipertensiva dos peptídeos obtidos por hidrólise;
- Analisar os hidrolisados com maior atividade bioativa em UPLC-massas;
- Comparar atividades bioativas obtidas na hidrólise de soro de leite com proteases de A03, com atividades bioativas obtidas na hidrólise *In sílico* usando a base de dados BIOPEP;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Soro de leite

A produção mundial do leite para o ano 2020 foi de 532.300 milhões de litros (FAO, EMBRAPA 2021). O Brasil uma produção de mais de 35.000 milhões de litros, dos quais mais de 25.522 milhões de litros foram inspecionados para a indústria, e desses 8.746 milhões de litros foram destinados para a produção de queijo, e com isso gerando também grandes quantidades de soro de leite (EMBRAPA, 2021).

O soro de leite ou soro de queijo foi considerado por muito tempo o poluente mais importante das águas residuais da indústria de laticínios, devido ao grande volume gerado e por seu elevado teor de matéria orgânica (WALZEM; DILLARD; GERMAN, 2002). O soro ao ser descartado de maneira inadequada, leva a grandes danos ao meio ambiente como, alta demanda de oxigênio, impermeabilização, eutrofização e toxicidade (MANN et al., 2019). Em um estudo recente (TRINDADE et al., 2019) foram estudadas 100 indústrias de laticínios, principalmente das regiões sudeste e do sul do Brasil, onde se encontrou que 28.207 de litros eram produzidos por dia, dos quais 5.782 litros foram de soro. Quanto ao soro de leite gerado, 67% das indústrias mencionaram que o soro foi totalmente utilizado para outros produtos, outros 13% relataram fazer um uso parcial do soro, e 27% das indústrias pesquisadas relatou não usar o soro de leite para fazer novos produtos descartando um total do soro produzido de 4.208 litros por dia em sistema de efluentes.

O soro de leite também denominado soro de queijo é uma fração remanescente da fabricação do queijo, que pode ocorrer pela coagulação ácida ou pelo uso de enzimas o qual quebra o sistema coloidal do leite em duas frações: uma fração sólida e uma fração líquida. A sólida que corresponde à caseína coagulada é usada na produção de queijos (WALZEM; DILLARD; GERMAN, 2002), está constituída por proteínas insolúveis e lipídios. Na fração líquida que corresponde ao soro de leite se encontram os demais componentes nutricionais que não foram incluídos na coagulação do leite. A fração do soro do leite tem componentes como lactose, aminoácidos, proteínas, peptídeos,

pequenos fragmentos de caseína, resíduos de gordura do leite, sais minerais (OLIVEIRA, 2003) e compostos biológicos e funcionais. O soro representa cerca de 85-90% do volume e retém ao redor de 55% dos nutrientes do leite (SISO, 1996). Das proteínas do leite cerca de 80% correspondem as caseínas (WALZEM; DILLARD; GERMAN, 2002) e 20% a proteínas do soro (JOVANOVIĆ; BARAĆ; MAČEJ, 2005).

As proteínas que constituem o soro de leite têm estrutura globular com algumas ligações dissulfeto que fornecem certo grau de estabilidade (CORREA, 2013) sendo as principais β -lactoglobulina e α -lactoalbumina correspondentes a cerca de 70-80% das proteínas totais. Aparecem em menor proporção imunoglobulinas, albumina, lisozima, lipase, lactoferrina e xantina oxidase (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006).

O valor biológico das proteínas do soro é alta quando comparada com outras proteínas de grau alimentar por seu grande conteúdo de aminoácidos essenciais, especialmente de cadeia ramificada (WALZEM; DILLARD; GERMAN, 2002). Todas as propriedades funcionais e bioativas do soro de leite têm feito com que a percepção do soro como poluente tenha mudado ao longo do tempo, sendo considerado agora como um coproduto na fabricação do queijo (BOER, 2014; SMITHERS, 2008).

3.2 Proteases microbianas

As proteases se definem como um tipo de enzimas que hidrolisam ligações peptídicas em proteínas, pode ser classificadas em endo ou exopeptidases, dependendo da posição do clivagem na cadeia polipeptídica, em relação ao pH de atividade (ácidas, alcalinas ou neutras), ou em relação ao sítio ativo ou catalítico onde as mais referenciadas na bibliografia são serina, cisteína, aspartil, treonina e metaloproteases (RAO et al., 1998).

Os microrganismos geralmente são bons produtores de proteases e também a principal fonte de isolamento de enzimas (DOS SANTOS AGUILAR; SATO, 2018; LAXMAN et al., 2005) sendo as bactérias e os fungos os principais produtores de

proteases comerciais devido a facilidade de cultivo e obtenção de maior quantidade de enzimas (DON; PILOSOFF; BARTHOLOMAI, 1991).

No mercado comercial e na área da pesquisa a maioria das proteases usadas são do gênero *Bacillus*, já que são importantes produtoras de enzimas, devido a suas altas taxas de crescimento em curtos períodos de fermentação, com capacidade de secretar proteínas no ambiente extracelular e muitas espécies são GRAS (geralmente reconhecidos como seguros).

As proteases são amplamente utilizadas na indústria farmacêutica, detergente e alimentos (BRANDELLI, 2008), também são utilizadas como substitutos de processos químicos na elaboração de produtos e nos processos de tratamento de resíduos industriais (RAO et al., 1998).

3.3 Proteases produzidas por microrganismos adaptados ao frio

Os microrganismos psicrófilos podem crescer em ambientes extremamente frios, como regiões polares ou mar profundo, solos desérticos frios, solos glaciais, regiões alpinas e outras regiões frias da terra (MORGAN-KISS et al., 2006).

Peptidases produzidas por microrganismos com atividade proteolítica a baixas temperaturas, possuem uma estrutura com um número menor de ligações de hidrogênio e dissulfeto, estas características fazem que as estruturas terciárias e quaternárias, estejam organizadas de uma forma mais aberta e flexível, facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima a diferença dos mesófilos (GERDAY; GLANSDORFF, 2007).

As enzimas derivadas de microrganismos psicrófilos tem características muito interessantes e atraentes para fins industriais e biotecnológicos. Estas enzimas têm uma alta atividade catalítica em temperaturas baixas e moderadas nas quais as enzimas de microrganismos mesófilos são inativas, assim como também reduzem a quantidade necessária de enzima requerida em uma reação (CAVICCHIOLI, 2016), aceleram os tempos de processos, previnem transformações químicas indesejáveis e as perdas de compostos voláteis (MARGESIN et al., 2003).

3.4 *Lysobacter* sp. A03

O gênero *Lysobacter* pertence à família Xanthomonadaceae, classe gamma-proteobactérias, são gram-negativas, aeróbios deslizantes, estão presentes no solo e nos habitats de água doce e de foram descritos por primeira vez em 1978 por Christensen e Cook. Este gênero tem a capacidade de produzir peptídeos que danificam as paredes celulares ou membranas de outros microrganismos como bactérias e fungos, já que alguns de estes peptídeos tem uma alta atividade antimicrobiana, como a lisocina um peptídeos cíclico composto de 12 aminoácidos com atividade antimicrobiana contra isolados de *S. aureus*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. pseudintermedius*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* (HAMAMOTO et al., 2015). Espécies de *Lysobacter* são conhecidas como produtoras de diversos compostos biotecnologicamente relevantes, como agentes de biocontrole contra fitopatógenos (JI et al., 2008), antibióticos como lisobactina (GUZMAN-MARTINEZ; LAMER; VANNIEUWENHZE, 2007) e enzimas maiormente produzidas por cepas de *Lysobacter enzymogenes* (EPSTEIN; WENSINK, 1988). Mais recentemente, cepas de *Lysobacter* também tem sido descritas como uma nova fonte de compostos naturais bioativos (XIE et al., 2012).

Lysobacter sp. A03 é uma bactéria que produz uma grande quantidade de enzimas proteolíticas quando cultivada com substratos queratinosos em temperaturas inferiores a 20 °C. Essa cepa foi isolada de penas de pinguim na Antártida, é produtora de enzimas com características de serino proteases, e sua estabilidade é aumentada na presença de íons metálicos (PEREIRA et al., 2014). Morfologicamente tem características muito interessantes, as células tem formato de bastonetes finos, suas colônias são pequenas e redondas e exibem uma cor amarelo brilhante, e seus pigmentos apresentam atividade antioxidante (PAILLIÉ JIMÉNEZ, 2017).

3.5 Peptídeos Bioativos

Os peptídeos bioativos podem ser definidos como sequencias de aminoácidos, que quando liberados da proteína parental, exercem efeitos benéficos nas funções

corporais e na saúde humana, e apresentam um alto valor nutricional (KITTS; WEILER, 2003). Estas sequencias peptídicas exercem funções biológicas quando são liberadas de sua proteína originária, através de hidrólise enzimática ou química (DALIRI; OH; LEE, 2017; KORHONEN; PIHLANTO, 2006; MIGUEL et al., 2009). Por sua vez estas sequencias peptídicas tem capacidade de realizar uma série de atividades biológicas, demonstrados em diversos estudos que descrevem peptídeos com atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-hipertensiva (BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015; CORREA, 2013; DE OLIVEIRA et al., 2015; KORHONEN; PIHLANTO, 2006; OSMAN et al., 2016; SOUZA et al., 2019) imunomoduladora e opióide (CHALAMAIAH; YU; WU, 2018; FERNÁNDEZ-TOMÉ et al., 2019; TIDONA et al., 2009).

Os peptídeos bioativos podem ser gerados de diferentes fontes como o leite, que é a principal fonte nutricional de peptídeos para mamíferos neonatais, já que é rico em proteínas e minerais (NIELSEN et al., 2017). Diversos autores relatam que o leite é uma grande fonte de peptídeos com atividade funcional, principalmente por suas proteínas constitutivas: caseína e proteínas do soro. Estes peptídeos podem ser produzidos através da hidrólise do proteínas do leite, mediada por proteases, gerando assim sequências de peptídeos com atividade biológica (KORHONEN; PIHLANTO, 2006).

3.6 Peptídeos antioxidantes

Se pode definir os antioxidantes como aquelas substâncias, que quando se encontram em baixas concentrações em comparação ao substrato oxidável, tem capacidade de inibir ou retardar consideravelmente a oxidação do substrato oxidando-se. Podem ser classificados como antioxidantes sintéticos ou naturais (ARUOMA; CUPPETT, 1997; GUPTA et al., 2009; SARMADI; ISMAIL, 2010). Peptídeos antioxidantes geralmente tem uma sequência de 5-11 aminoácidos, incluindo aminoácidos hidrofóbicos, prolina, histidina, tirosina e triptofano (ZHOU et al., 2012).

Os peptídeos com atividade antioxidante, são essencialmente importantes por sua contribuição para a saúde, já que participam na prevenção de doenças cardiovasculares

e cerebrovasculares, câncer, artrites reumatoide ou diabetes (MONTROYA-RODRÍGUEZ; DE MEJÍA, 2015). Além disso, apresentam propriedades promissoras como aditivos de processamento para alimentos, já que exercem propriedades antioxidantes como atividade quelante e capacidade inibitória da peroxidação lipídica (ZOU et al., 2016).

A oxidação dos constituintes dos alimentos é um evento chave na deterioração dos alimentos. A peroxidação lipídica em alimentos pode causar deterioração na qualidade dos alimentos e encurtar o período de vida útil. A peroxidação lipídica também pode gerar radicais livres, que podem causar a decomposição de ácidos graxos essenciais, resultando na redução do valor nutricional e da segurança dos alimentos, produzindo sabores desagradáveis e substâncias tóxicas (NIKI et al., 2005).

Os antioxidantes sintéticos como butilhidroxitolueno (BHT), hidroxibutilanisol (BHA), n-propil galato (PG) e terc-butilhidroquinona (TBHQ), tem tido seu uso restrito devido a potenciais efeitos tóxicos em humanos, ao contrário dos peptídeos antioxidantes que são considerados antioxidantes naturais. Portanto, existe um aumento no interesse e conhecimento das propriedades antioxidantes de peptídeos bioativos como alternativas aos antioxidantes sintéticos convencionais (XUE et al., 2009; ZHANG et al., 2009).

Algumas proteínas são potenciais antioxidantes, com capacidade de sequestrar radicais livres (ABTS e DPPH) e de inibir a oxidação lipídica nos alimentos. Um exemplo são as proteínas oriundas do leite e de soja, que têm mostrado atividade antioxidante em alimentos como carne de porco. A albumina sérica, por exemplo, pode retardar a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (FARAJI; DECKER; AARON, 1991), mas a hidrólise de proteínas usando enzimas proteolíticas de diferentes fontes, pode aumentar sua capacidade antioxidante devido a liberação de sequências curtas (peptídeos com atividade biológica) (CHEN; MURAMOTO; YAMAUCHI, 1995; WANG; MEJIA, 2005).

Peptídeos com atividade antioxidante podem ser obtidos e gerados através da hidrólise de várias proteínas alimentares, como a proteína de soja e proteínas do leite (caseínas e soro) (CORRÊA et al., 2011, 2014a; OLIVEIRA et al., 2014; SOUZA et al., 2019; WANG et al., 2019). Os hidrolisados de soro de leite, caseína, gema de ovo, soja

tem demonstrado inibir a oxidação de lipídeos em vários alimentos de origem animal como carne bovina, suína e atum (OLIVEIRA et al., 2014; SAKANAKA; TACHIBANA, 2006).

3.7 Peptídeos Antimicrobianos

Na área da agricultura e na indústria de alimentos, a aplicabilidade dos peptídeos antimicrobianos tem ganhado força, já que algumas moléculas apresentam eficiência contra certos microrganismos, sem apresentar risco algum na saúde humana e animal (BLAIR et al., 2015; KEYMANESH; SOLTANI; SARDARI, 2009).

Os mecanismos pelos quais os peptídeos antimicrobianos agem sobre as bactérias sensíveis vem sendo investigados. Estes peptídeos atuam primariamente na membrana plasmática através do estabelecimento de uma ligação eletrostática entre o peptídeo (catiônicos) e componentes de membrana (grupos fosfatos carregados negativamente). O caráter hidrofóbico de alguns peptídeos permite a interação com os lipídios da membrana. Tal interação resulta na formação de um canal transmembrana transiente que altera a permeabilidade e/ou geração de energia, enquanto preserva a integridade da célula ou resulta na ruptura da membrana plasmática com consequente desintegração da célula intacta. No entanto, o alvo final não é sempre a membrana em si, já que o peptídeo pode transpor o citoplasma e agir sobre os componentes intracelulares, interferindo nas funções celulares ou causando a floculação do citoplasma (BENKERROUM, 2010; GOBBETTI; MINERVINI; RIZZELLO, 2004).

As proteínas do leite constituem uma reserva natural de peptídeos bioativos com propriedades fisiológicas e antimicrobianas. A liberação desses peptídeos é gerada pela hidrólise das moléculas precursoras, mediadas por proteases digestivas ou fermentação com microrganismos proteolíticos (BENKERROUM, 2010).

As proteínas do soro (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, albumina sérica, imunoglobulinas, lactoferrinas, lisozima, entre outras) são conhecidas como fontes de peptídeos bioativos com atividade antimicrobiana (BENKERROUM, 2010). As

lactoferricinas derivadas das lactoferrinas bovina e humana, geradas pela clivagem enzimática por pepsina, são peptídeos muito estudados já que exibem inibição contra uma grande variedade de espécies microbianas, como *L. monocytogenes*, e propriedades bacteriostáticas e bactericidas mais potentes que a sequência completa da lactoferrina (GOBBETTI; MINERVINI; RIZZELLO, 2004; SILVA; MALCATA, 2005).

3.8 Peptídeos Anti-hipertensivos

Os peptídeos de origem láctea são alternativas como agentes anti-hipertensivos, atuando diretamente como inibidores da enzima conversora da angiotensina I (ECA-I) (BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015; IBRAHIM; AHMED; MIYATA, 2017; OLIVEIRA et al., 2014). A ECA-I é uma carboxipeptidase que converte a angiotensina I (um decapeptídeo) em angiotensina II (um octapeptídeo) tendo uma forte ação vasoconstritora (HARTMANN; MEISEL, 2007). Ela tem uma função no sistema renina-angiotensina, regulando a pressão arterial e o equilíbrio de água e sal no organismo. Um aumento na pressão arterial é observado quando a enzima catalisa a hidrólise da angiotensina I em angiotensina II (COATES, 2003).

O mecanismo de ação dos peptídeos anti-hipertensivos ocorre de forma similar aos fármacos. Resíduos de aminoácidos adjacentes à região C-terminal que apresenta atividade se enlaçam fortemente ao sítio ativo da ECA-I. Além disso, interações aniônicas em locais distintos da região catalítica do sítio ativo já foram relatados, produzindo um tipo de inibição alostérica. Os aminoácidos localizados no tripeptídeo C-terminal são importantes para a ligação com a enzima, como os hidrofóbicos (aromáticos, com cadeias ramificadas) e os aminoácidos básicos arginina e lisina. A prolina na porção C-terminal tem mostrado contribuir para a correta localização do peptídeo no sítio ativo da ECA-I, provavelmente por sua estrutura rígida permitir ao grupo carboxila uma adequada conformação para interagir com o resíduo positivamente carregado do sítio ativo da enzima. Também tem sido relatado que peptídeos contendo prolina são mais resistentes as enzimas digestivas (GÓMEZ-RUIZ et al., 2006).

Os inibidores sintéticos da ECA-I, como captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril e ramipril foram identificados e usados para o tratamento da hipertensão. Esses inibidores sintéticos podem ter efeitos colaterais como alteração no paladar, tosse e erupção cutânea (AGOSTONI; CICARDI, 2001; CHEN et al., 2013), por isso tem crescido a necessidade de desenvolver outros tratamentos de origem mais natural (IBRAHIM; AHMED; MIYATA, 2017).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os materiais e métodos, resultados e discussão deste trabalho estão apresentados em forma de artigo intitulado “Avaliação de atividades biológicas de hidrolisados de soro de leite bovino com proteases de *Lysobacter* sp A03”

REFERENCIAS

- AGOSTONI, A.; CICARDI, M. Drug-induced angioedema without urticaria. **Drug safety**, v. 24, n. 8, p. 599–606, 2001.
- ALIZADEH, O.; ALIAKBARLU, J. Effects of ultrasound and ohmic heating pretreatments on hydrolysis, antioxidant and antibacterial activities of whey protein concentrate and its fractions. **LWT**, v. 131, p. 109913, 2020.
- ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. [s.l.] Editora Manole Ltda, 2003.
- ARUOMA, O. I.; CUPPETT, S. L. **Antioxidant methodology: in vivo and in vitro concepts**. [s.l.] The American Oil Chemists Society, 1997.
- ATHIRA, S. et al. Preparation and characterization of iron-chelating peptides from whey protein: An alternative approach for chemical iron fortification. **Food Research International**, v. 141, p. 110133, 2021.
- BENKERROUM, N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 3, p. 320–338, 2010.
- BLAIR, J. M. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015.
- BOER, R. DE. **From Milk By-Products to Milk Ingredients: Upgrading the Cycle**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2014.
- BOTTESINI, C. et al. Antioxidant capacity of water soluble extracts from Parmigiano-Reggiano cheese. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 64, n. 8, p. 953–958, 2013.
- 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.; CORRÊA, A. P. F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. **Food Research International**, v. 73, p. 149–161, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1 jan. 1995.
- BUZZINI, P. et al. Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. **FEMS microbiology ecology**, v. 82, n. 2, p. 217–241, 2012.

CASTELLANO, P. et al. Peptides with angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity generated from porcine skeletal muscle proteins by the action of meat-borne Lactobacillus. **Journal of Proteomics**, v. 89, p. 183–190, 26 ago. 2013.

CAVICCHIOLI, R. On the concept of a psychrophile. **The ISME journal**, v. 10, n. 4, p. 793–795, 2016.

CHALAMAIAH, M.; YU, W.; WU, J. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. **Food chemistry**, v. 245, p. 205–222, 2018.

CHEN, H.-M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F. Structural Analysis of Antioxidative Peptides from Soybean .beta.-Conglycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 3, p. 574–578, mar. 1995.

CHEN, J. et al. Comparison of analytical methods to assay inhibitors of angiotensin I-converting enzyme. **Food chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3329–3334, 2013.

COATES, D. The angiotensin converting enzyme (ACE). **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 35, n. 6, p. 769–773, 2003.

CORRÊA, A. P. F. et al. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 12, p. 2247–2254, 2011.

CORREA, A. P. F. Obtenção de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de caseinato ovino e soro de queijo ovino. 2013.

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

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

DA SILVA, J. D. F. et al. Buffalo cheese whey hydrolyzed with Alcalase as an antibrowning agent in minimally processed apple. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 9, p. 3731–3738, 1 set. 2018.

DALIRI, E. B.-M.; OH, D. H.; LEE, B. H. Bioactive peptides. **Foods**, v. 6, n. 5, p. 32, 2017.

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

DEL MAR CONTRERAS, M. et al. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 9–15, 2011.

DON, L. B.; PILOSOF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 68, n. 2, p. 102–105, 1991.

DOS 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.

DRYÁKOVÁ, A. et al. Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. **European Food Research and Technology**, v. 230, n. 6, p. 865–874, 1 abr. 2010.

EPSTEIN, D. M.; WENSINK, P. C. The alpha-lytic protease gene of *Lysobacter enzymogenes*. The nucleotide sequence predicts a large prepro-peptide with homology to pro-peptides of other chymotrypsin-like enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 32, p. 16586–16590, 1988.

FARAJI, H.; DECKER, E. A.; AARON, D. K. Suppression of lipid oxidation in phosphatidylcholine liposomes and ground pork by spray-dried porcine plasma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 7, p. 1288–1290, jul. 1991.

FERNÁNDEZ-TOMÉ, S. et al. Immunomodulatory effect of gut microbiota-derived bioactive peptides on human immune system from healthy controls and patients with Inflammatory Bowel Disease. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2605, 2019.

GANGOPADHYAY, N. et al. In silico and in vitro analyses of the angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates generated from crude barley (*Hordeum vulgare*) protein concentrates. **Food Chemistry**, v. 203, p. 367–374, 2016.

GERDAY, C.; GLANSDORFF, N. **Physiology and biochemistry of extremophiles**. [s.l.] ASM press, 2007.

GOBBETTI, M.; MINERVINI, F.; RIZZELLO, C. G. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2–3, p. 173–188, 2004.

GÓMEZ-RUIZ, J. Á. et al. Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. **European Food Research and Technology**, v. 223, n. 5, p. 595–601, 2006.

GUPTA, A. et al. Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 3, p. 339–347, 2009.

GUZMAN-MARTINEZ, A.; LAMER, R.; VANNIEUWENHZE, M. S. Total synthesis of lysobactin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 18, p. 6017–6021, 2007.

HAMAMOTO, H. et al. Lysocin E is a new antibiotic that targets menaquinone in the bacterial membrane. **Nature chemical biology**, v. 11, n. 2, p. 127–133, 2015.

HAN, R. et al. Comparison of alcalase-and pepsin-treated oilseed protein hydrolysates—Experimental validation of predicted antioxidant, antihypertensive and antidiabetic properties. **Current research in food science**, v. 4, p. 141–149, 2021.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. DE; PAULA, H. DE. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Rev Nutr**, v. 19, n. 4, p. 479–88, 2006.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current opinion in biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 163–169, 2007.

HE, R. et al. Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 432–438, 2012.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. et al. Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 10, p. 805–812, 2002.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RECIO, I.; AMIGO, L. β -Lactoglobulin as source of bioactive peptides. **Amino acids**, v. 35, n. 2, p. 257–265, 2008.

HONG, S. et al. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme: importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. 1980.

IBRAHIM, H. R.; AHMED, A. S.; MIYATA, T. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. **Journal of advanced research**, v. 8, n. 1, p. 63–71, 2017.

IROYUKIFUJITA, H.; EIICHIYOKOYAMA, K.; YOSHIKAWA, M. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. **Journal of food science**, v. 65, n. 4, p. 564–569, 2000.

Jl, G.-H. et al. Biological control of rice bacterial blight by *Lysobacter antibioticus* strain 13-1. **Biological control**, v. 45, n. 3, p. 288–296, 2008.

JOVANOVIĆ, S.; BARAĆ, M.; MAĆEJ, O. Whey proteins-properties and possibility of application. **Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka**, v. 55, n. 3, p. 215–233, 2005.

KEYMANESH, K.; SOLTANI, S.; SARDARI, S. Application of antimicrobial peptides in agriculture and food industry. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 933–944, 2009.

KITTS, D. D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current pharmaceutical design**, v. 9, n. 16, p. 1309–1323, 2003.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **International dairy journal**, v. 16, n. 9, p. 945–960, 2006.

KUMAR, D. et al. Enzymatic hydrolysis of camel milk casein and its antioxidant properties. **Dairy Science & Technology**, v. 96, n. 3, p. 391–404, 2016.

LAXMAN, R. S. et al. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 3152–3158, 2005.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

MANN, B. et al. Bioactive peptides from whey proteins. In: **Whey proteins**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 519–547.

MARGESIN, R. et al. Cold-adapted microorganisms: adaptation strategies and biotechnological potential. **Encyclopedia of environmental microbiology**, 2003.

MATSUFUJI, H. et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 58, n. 12, p. 2244–2245, 1994.

MAZORRA-MANZANO, M. A. et al. Cheese whey fermentation by its native microbiota: Proteolysis and bioactive peptides release with ACE-inhibitory activity. **Fermentation**, v. 6, n. 1, p. 19, 2020.

MEIRA, S. M. M. et al. Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 322–329, 2012.

MEUCCI, E.; MORDENTE, A.; MARTORANA, G. E. Metal-catalyzed oxidation of human serum albumin: conformational and functional changes. Implications in protein aging. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 8, p. 4692–4699, 1991.

MIGUEL, M. et al. ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 211–214, 2009.

MONTOYA-RODRÍGUEZ, A.; DE MEJÍA, E. G. Pure peptides from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) proteins inhibit LOX-1 receptor and cellular markers associated with atherosclerosis development in vitro. **Food Research International**, v. 77, p. 204–214, 2015.

MORGAN-KISS, R. M. et al. Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 70, n. 1, p. 222–252, 2006.

NANJO, F. et al. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 21, n. 6, p. 895–902, 1996.

NIELSEN, S. D. et al. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. **Food chemistry**, v. 232, p. 673–682, 2017.

NIKI, E. et al. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 338, n. 1, p. 668–676, 2005.

OKADA, Y.; OKADA, M. Scavenging Effect of Water Soluble Proteins in Broad Beans on Free Radicals and Active Oxygen Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 401–406, 1 fev. 1998.

OLIVEIRA, C. F. et al. Antioxidant activity and inhibition of meat lipid oxidation by soy protein hydrolysates obtained with a microbial protease. **International food research journal**, v. 21, n. 2, p. 775, 2014.

OLIVEIRA, L. DE S. C. Influencia da temperatura, grau de expansão e altura do leite sobre a recuperação e purificação de alfa-lactalbumina a partir do soro de leite bovino em leite expandido de resina hidrofobica. 2003.

OSMAN, A. et al. Antibacterial peptides generated by Alcalase hydrolysis of goat whey. **LWT-Food science and technology**, v. 65, p. 480–486, 2016.

OTTE, J. et al. Protease-induced aggregation and gelation of whey proteins. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 5, p. 911–916, 1996.

OTTE, J. et al. Hydrolysis of bovine β -lactoglobulin by various proteases and identification of selected peptides. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 12, p. 835–848, 1997.

PAILLIÈ JIMÉNEZ, M. E. Produção e caracterização de pigmentos produzidos por *Chryseobacterium* KR6 e *Lysobacter* A03. 2017.

PEÑA-RAMOS, E. A.; XIONG, Y. L.; ARTEAGA, G. E. Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 14, p. 1908–1918, 2004.

PEREIRA, J. Q. et al. Isolation of three novel Antarctic psychrotolerant feather-degrading bacteria and partial purification of keratinolytic enzyme from *Lysobacter* sp. A03. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 1–7, 2014.

PEREIRA, J. Q. et al. Whole-genome shotgun sequence of the keratinolytic bacterium *Lysobacter* sp. A03, isolated from the Antarctic environment. **Genome announcements**, v. 3, n. 2, 2015.

PEREIRA, J. Q. et al. A new cold-adapted serine peptidase from Antarctic *Lysobacter* sp. A03: Insights about enzyme activity at low temperatures. **International journal of biological macromolecules**, v. 103, p. 854–862, 2017.

PHANTURAT, P. et al. Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 86–97, 2010.

PHELAN, M. et al. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. **International dairy journal**, v. 19, n. 11, p. 643–654, 2009.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y. Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. **Food Chemistry**, v. 95, n. 2, p. 243–249, 2006.

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

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

SISO, M. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource technology**, v. 57, n. 1, p. 1–11, 1996.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. **International Dairy Journal**, MILESTONE ACHIEVEMENTS IN DAIRY SCIENCE RESEARCH AND THEIR CURRENT AND FUTURE INDUSTRIAL APPLICATIONS. v. 18, n. 7, p. 695–704, 1 jul. 2008.

SOUZA, R. S. C. DE et al. Avaliação do potencial antioxidante de proteínas do soro de leite concentradas por ultrafiltração e hidrolisadas por diferentes proteases comerciais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, 2019.

TARANGO-HERNÁNDEZ, S. et al. Potential of Fresco-style cheese whey as a source of protein fractions with antioxidant and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 11, p. 7635–7639, 2015.

TIDONA, F. et al. Bioactive peptides in dairy products. **Italian Journal of Animal Science**, v. 8, n. 3, p. 315–340, 2009.

TONG, L. M. et al. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1473–1478, 2000.

TRINDADE, M. B. et al. Cheese whey exploitation in Brazil: a questionnaire survey. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 788–791, 2019.

VAVRUSOVA, M. et al. Characterisation of a whey protein hydrolysate as antioxidant. **International Dairy Journal**, v. 47, p. 86–93, 2015.

WALZEM, R. L.; DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 42, n. 4, p. 353–375, 2002.

WANG, R. et al. Preparation of bioactive peptides with antidiabetic, antihypertensive, and antioxidant activities and identification of α -glucosidase inhibitory peptides from soy protein. **Food science & nutrition**, v. 7, n. 5, p. 1848–1856, 2019.

WANG, T.-Y. et al. A study to evaluate the potential of an in silico approach for predicting dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity in vitro of protein hydrolysates. **Food chemistry**, v. 234, p. 431–438, 2017.

WANG, W.; MEJIA, E. G. D. A New Frontier in Soy Bioactive Peptides that May Prevent Age-related Chronic Diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 4, n. 4, p. 63–78, 2005.

WILCHEK, M.; BAYER, E. A. *Methods in enzymology*. 1990.

XIE, Y. et al. Bioactive natural products from *Lysobacter*. **Natural product reports**, v. 29, n. 11, p. 1277–1287, 2012.

XUE, Z. et al. Preparation and antioxidative properties of a rapeseed (*Brassica napus*) protein hydrolysate and three peptide fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5287–5293, 2009.

ZHANG, J. et al. Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: identification of the active peptide. **European Food Research and Technology**, v. 229, n. 4, p. 709–719, 2009.

ZHANG, L.; LI, J.; ZHOU, K. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. **Bioresource technology**, v. 101, n. 7, p. 2084–2089, 2010.

ZHOU, D.-Y. et al. In vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 2, p. 148–154, 2012.

ZOU, T.-B. et al. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 72, 2016.