

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS A PARTIR DA
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE CASEINATO OVINO E SORO DE
QUEIJO OVINO**

ANA PAULA FOLMER CORRÊA

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS A PARTIR DA
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE CASEINATO OVINO E SORO DE
QUEIJO OVINO**

ANA PAULA FOLMER CORRÊA
Química Industrial – Universidade Federal de Santa Maria UFSM
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - UFRGS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (Área de Concentração: Microbiologia Industrial) como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março de 2013

CIP - Catalogação na Publicação

folmer correa, Ana Paula
OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS A PARTIR DA
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE CASEINATO OVINO E SORO DE
QUEIJO OVINO / Ana Paula folmer correa. -- 2013.
101 f.

Orientador: Adriano Brandelli.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. peptídeos bioativos. 2. antioxidante. 3. anti-
hipertensivo. I. Brandelli, Adriano, orient. II.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Adriano Brandelli, pela orientação no Mestrado e Doutorado. Pelo apoio e confiança.

A todo o pessoal do laboratório 218, pelo carinho, ajuda, troca de experiências, companheirismo e alegria. Em especial para Indjara, Roberta, Paula, Juliana e Flávio.

A Stela pela grande ajuda durante meu doutorado e pela parceria no laboratório e fora dele.

De forma especial à Daniel Joner Daroit pelas correções e colaborações nos artigos. Meu irmão de coração.

Aos integrantes dos laboratórios de responsabilidade dos professores Plinho e Eduardo e ao Rober, pelo auxílio com materiais e equipamentos.

Ao Jéferson Segalin, pela disponibilidade e grande ajuda na tentativa de identificação dos peptídeos.

À CAPES, pelo indispensável apoio financeiro.

Aos meus pais, Sueli e Wilson, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim, pela presença nos momentos mais importantes, pelo amor e incentivo.

As minhas irmãs Glória e Raquel pela força e importância em minha vida.

Ao meu namorado, Vítor, por estar sempre ao meu lado, pela compreensão, ajuda e apoio nesses 4 anos.

À coordenação, professores, funcionários e colegas do PPGMAA.

Obtenção de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de caseinato ovino e soro de queijo ovino¹

Autor: Ana Paula Folmer Corrêa

Orientador: Adriano Brandelli

RESUMO

Peptídeos bioativos são foco de pesquisas devido ao interesse relacionado a suas propriedades antioxidantes, anti-hipertensivas, entre outras. Enzimas proteolíticas microbianas aparecem como potentes biocatalisadores para a obtenção de hidrolisados protéicos e peptídeos bioativos em escala industrial/comercial. Neste estudo, hidrolisados de caseinato ovino e soro de queijo ovino foram produzidos utilizando enzimas proteolíticas de *Bacillus* sp. P7, e as atividades antioxidantes (sequestro de radicais, atividade quelante de ferro e poder redutor), antimicrobiana e anti-hipertensiva (inibição da enzima conversora de angiotensina-I (ECA)) dos hidrolisados foram avaliadas. A atividade antioxidante dos hidrolisados de caseinato ovino, quando avaliada pelo método da captura do radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiasolina-6-ácido sulfônico) aumentou com o tempo de hidrólise em até 2 h, mantendo-se estável durante 4 h. Os hidrolisados mostraram baixa capacidade em capturar o radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), apresentando maior atividade (31%) após 1 h de hidrólise. A capacidade de quelação de Fe^{2+} foi máxima em 0,5 h de hidrólise (83,3%), decrescendo em seguida, e o maior poder redutor foi observado após 1h de hidrólise. A inibição da atividade da ECA aumentou até 2h de hidrólise (94% de inibição), diminuindo após esse tempo. Hidrolisados após 3h mostraram inibir a multiplicação de *Bacillus cereus*, *Corynebacterium fimi*, *Aspergillus fumigatus*, e *Penicillium expansum*. Nos hidrolisados de soro de queijo ovino a proteína solúvel e aminoácidos livres tenderam a aumentar durante o tempo de hidrólise por até 4h. A atividade antioxidante dos hidrolisados avaliados pelo método da captura do radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiasolina-6-ácido sulfônico), aumentou de 0h (15,9%) para 6h (51,3%). A máxima quelação de Fe^{2+} foi observada em hidrolisados após 3h, e o pico do poder redutor em 1h de hidrólise, representando aumentos de 6,2 e 2,1 vezes, respectivamente, quando comparado com o soro de queijo não hidrolisado. A inibição da ECA pelo soro de queijo ovino (12%) aumentou através da hidrólise, alcançando valor máximo (55% inibição) em 4h de hidrólise; no entanto, uma inibição de 42% foi observada após 1h de hidrólise.

1/ Tese de doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (101 p.) Março, 2013.

Obtaining bioactive peptides from enzymatic hydrolysis of caseinate and sheep cheese whey¹

Author: Ana Paula Folmer Corrêa

Orientation: Adriano Brandelli

ABSTRACT

Bioactive peptides are a focus of research due to the interest related to their antioxidant and antihypertensive properties, among others. Microbial proteolytic enzymes appear as potent biocatalysts to obtain protein hydrolysates and bioactive peptides on an industrial/commercial scale. In this study, ovine cheese whey and ovine caseinate were produced using proteolytic enzymes from *Bacillus* sp. P7, and the antioxidant (scavenging of the radical, iron-chelating activity, and reducing power), antimicrobial, and antihypertensive (inhibition of the angiotensin-I converting enzyme(ACE)) activities of the hydrolysates were evaluated. Antioxidant activity measured by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid method increased with hydrolysis time up to 2 h, remaining stable for up to 4 h. Hydrolysates showed low 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging abilities, with higher activity (31%) reached after 1 h of hydrolysis. Fe²⁺-chelating ability was maximum for 0.5 h hydrolysates (83.3%), decreasing thereafter; and the higher reducing power was observed after 1h of hydrolysis. ACE-inhibitory activity was observed to increase up to 2 h of hydrolysis (94% of inhibition), declining afterwards. 3 h hydrolysates were shown to inhibit the growth of *Bacillus cereus*, *Corynebacterium fimi*, *Aspergillus fumigatus*, and *Penicillium expansum*. Soluble protein and free amino acids tended to increase during hydrolysis of SCW for up to 4 h. Antioxidant activity of hydrolysates, evaluated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid radical scavenging method, increased 3.2-fold from 0 h (15.9%) to 6 h of hydrolysis (51.3%). Maximum Fe²⁺ chelation was reached in 3-h hydrolysates, and the reducing power peaked at 1 h of hydrolysis, representing 6.2- and 2.1-fold increments, respectively, when compared to that of non-hydrolyzed SCW. ACE inhibition by SCW (12%) was improved through hydrolysis, reaching maximal values (55% inhibition) in 4-h hydrolysates; however, a 42% inhibition was already observed after 1 h of hydrolysis.

1/Doctoral Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (101 p.) March, 2013.

SUMÁRIO

RESUMO	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1 Proteases	03
2.2 Leite ovino e sua composição	05
2.3 Caseínas e caseinatos	09
2.4 Soro	11
2.5 Compostos bioativos	15
2.5.1 Peptídeos antimicrobianos	17
2.5.2 Peptídeos antioxidantes	19
2.5.3 Peptídeos anti-hipertensivos	21
2.6 Hidrólise enzimática de proteínas	22
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
3.1 Resultados I	26
3.2 Resultados II	34
3.3 Resultados III	60
4 DISCUSSÃO GERAL	73
5 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Atividades biológicas dos hidrolisados de caseinato ovino.....	66
TABELA 2. Atividades antimicrobianas de hidrolisados de caseinato ovino utilizando membrana de corte de 10 KDa	67
TABELA 3. Identificação dos peptídeos do caseinato ovino.....	68
TABELA 4. Atividades biológicas dos hidrolisados de soro de queijo ovino	70
TABELA 5. Identificação dos peptídeos do hidrolisado de proteínas do soro.....	71

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.. Espectro de massas em tandem (MS/MS) do íon m/z 714,3916. Após interpretação da sequência e busca em banco de dados, o espectro MS/MS foi condizente com o fragmento 118-129 da caseína α_{s1}**68**

FIGURA 2.. Espectro de massas em tandem (MS/MS) do íon m/z 778,8811. Após interpretação da sequência e busca em banco de dados, o espectro MS/MS foi condizente com o fragmento 167-180 da β -lactoglobulina.....**71**

1. INTRODUÇÃO

Peptídeos bioativos são, atualmente, foco de muitas pesquisas relacionadas principalmente às atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-hipertensiva. As proteínas lácteas constituem uma fonte potencial destes compostos e estão entre as mais estudadas. As atividades biológicas e fisiológicas das proteínas do leite são atribuídas a diversos peptídeos críticos presentes na estrutura protéica. Tais peptídeos não apresentam atividade biológica na proteína nativa, sendo liberados através de hidrólise. As propriedades dos peptídeos bioativos derivados de proteínas do leite têm sido exaustivamente investigadas, e um número crescente de tais moléculas têm sido identificadas em hidrolisados destas proteínas e em produtos lácteos fermentados. Investigações relatam geralmente a produção de peptídeos bioativos, através da hidrólise de proteínas do leite bovino. No entanto, as proteínas do leite de diferentes espécies (ovinos e caprinos, por exemplo), e a alta variabilidade genética das proteínas do leite podem originar diferentes peptídeos bioativos. A maneira mais comum para gerar peptídeos bioativos é através da hidrólise enzimática de moléculas da proteína nativa.

Para a obtenção de hidrolisados com qualidade nutricional elevada e com propriedades desejáveis e agradáveis ao consumidor, é importante o controle das condições hidrolíticas, como pH, temperatura, enzima, tempo de hidrólise, tipo e concentração do substrato, relação enzima:substrato e inativação enzimática ao final do processo.

Vários peptídeos já foram isolados e caracterizados, apresentando atividades antioxidantes, imunomodulatória, antimicrobiana e antiviral, antitumoral, antiúlcera, antihipertensiva, anticoagulante, opióide, ergogênica, hipocolesterôlemica, e moduladora dos fatores de crescimento celular.

Enzimas proteolíticas provenientes de várias fontes (animal, vegetal e microbiana) têm sido empregadas com sucesso na produção de peptídeos bioativos. Como os microrganismos podem ser cultivados através de métodos bem estabelecidos, produzindo grandes quantidades de enzimas, as proteases microbianas aparecem como interessantes biocatalisadores para a obtenção de hidrolisados protéicos e peptídeos bioativos em escala comercial. Dada a potencialidade da hidrólise enzimática na obtenção de peptídeos bioativos, a investigação de novas enzimas proteolíticas representa um importante recurso que visa desenvolver novos produtos e processos biotecnológicos com aplicação comercial/industrial a partir de diferentes matérias-primas, como o soro de queijo e o caseinato ovino.

Nesse contexto, os objetivos desse estudo foram: a) verificar os efeitos da hidrólise controlada de caseinato ovino e soro de queijo ovino, pela ação de uma protease bacteriana parcialmente purificada; b) purificar e identificar os peptídeos bioativos produzidos através desta hidrólise controlada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROTEASES

Proteases, também denominadas proteinases ou peptidases, são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas em proteínas e peptídeos, formando um complexo grupo de enzimas que varia enormemente em suas características físico-químicas e catalíticas (RAO *et al.*, 1998).

Estas enzimas participam de processos metabólicos essenciais, e sua importância é evidenciada pela ocorrência em todas as formas de vida (GUPTA *et al.*, 2002a). As proteases são usualmente classificadas segundo critérios majoritários, como: (a) tipo de reação catalisada, em endo ou exoproteases, dependendo do local de clivagem em relação às regiões terminais do substrato; (b) pH de atividade ótima, em proteases ácidas, neutras ou alcalinas; (c) natureza química e mecanismo do sítio catalítico, em serino-proteases, cisteína-proteases, aspartil-proteases, metaloproteases, ou de tipo catalítico desconhecido; e (d) relações evolucionárias no que diz respeito à sua estrutura (RAO *et al.*, 1998; RAWLINGS & BARRET, 1993).

Proteases realizam modificações altamente específicas e seletivas em proteínas, desempenhando funções cruciais em processos fisiológicos. As proteases extracelulares atuam de forma importante na nutrição através da

hidrólise de proteínas, facilitando a absorção dos produtos pelas células, sendo também importantes em processos patológicos e de antagonismo (RAO *et al.*, 1998; PAGE & DI CERA, 2008a,b).

As proteases representam um dos três maiores grupos de enzimas industriais, sendo responsáveis por cerca de 60% do total de vendas de enzimas mundialmente. Elas são fisiologicamente importantes para a vida dos organismos, e são encontradas em uma grande diversidade de fontes tais como plantas, animais e microrganismos (RAO *et al.*, 1998). As proteases produzidas por plantas requerem um processo de obtenção mais demorado, pois dependem da disponibilização de área para cultivo e também das condições climáticas. As proteases de origem animal dependem da disponibilidade de animais para o abate, tornando o processo dispendioso. Neste contexto, os microrganismos são preferidos frente a outras fontes de proteases devido ao seu rápido crescimento e ao pequeno espaço requerido para seu cultivo (RAO *et al.*, 1998). Além disso, as proteases microbianas são, em geral, mais estáveis que as homólogas de plantas e animais e o seu processo de produção é mais fácil e mais seguro (WISEMAN, 1991).

Os microrganismos responsáveis pela produção de proteases são os fungos e as bactérias, devido à maior facilidade de cultivo e obtenção da enzima (BERNARDI *et al.*, 1991). Em geral, as enzimas fúngicas têm um pH ótimo ácido ou neutro, não sendo termoestáveis. Por outro lado, as proteases bacterianas possuem um pH ótimo alcalino ou neutro, sendo com frequência termoestáveis (WISEMAN, 1991). Espécies do gênero *Bacillus*, principalmente, possuem alta capacidade de produção de proteases alcalinas, que são

amplamente utilizadas nas indústrias e possuem alta atividade catalítica (JOO & CHANG, 2005). Para espécies de *Bacillus*, a produção de proteases é fortemente influenciada por fatores físicos como pH, temperatura e tempo de incubação, além de fatores como componentes do meio e a presença de íons metálicos (NEHETE *et al.*, 1985, JOHNVESLY & NAIK, 2001).

Além das inúmeras funções celulares, as proteases são também relevantes para a biologia, a medicina e a biotecnologia. Estas enzimas podem ser utilizadas como componentes de detergentes, na indústria de alimentos, couros, em processos de tratamento de resíduos e biorremediação, na síntese de peptídeos, na indústria de produtos farmacêuticos, entre outras aplicações (ANWAR & SALEEMUDDIN, 1998; KUMAR & TAKAGI, 1999; GUPTA *et al.*, 2002a; SUMANTHA *et al.*, 2006; SANCHEZ & DEMAIN, 2011).

2.2 LEITE OVINO E SUA COMPOSIÇÃO

Por milhares de anos, a produção de leite ovino e caprino tem sido a base de vida em muitas áreas do mundo, como por exemplo, Iraque, Iran, Síria e Turquia. As ovelhas, certamente foram os primeiros animais a serem domesticados pelo homem (BERGER, 2005).

A produção de leite em ovinos tem sido vista como uma alternativa sustentável, de baixo investimento inicial e de fácil adoção pela mão de obra familiar, podendo melhorar a qualidade de vida dos pequenos e médios produtores rurais (SOUZA *et al.*, 2005; CORRÊA *et al.*, 2006; SUÁREZ & BUSETTI, 2006). Com exceção de algumas situações de economias de subsistência, em que o leite é consumido *in natura*, a maior parte do leite de ovelha obtido é transformada em queijo e, em menor escala, em iogurte. Mais

concentrado que o leite de vaca e cabra, o leite de ovelha está indicado para a fabricação de queijos com aromas e sabores especiais, de alto valor comercial, e pode aumentar o retorno financeiro do ovinocultor (SOUZA *et al.*, 2005; SUÁREZ & BUSETTI, 2006).

A produção de leite ovino ainda é uma atividade pouco conhecida, embora existam animais de raças com aptidão leiteira, como é o caso da Lacaune e da Bergamácia (BRITO *et al.*, 2006; SÁ *et al.*, 2005).

Os primeiros ovinos da raça Lacaune foram trazidos ao Brasil em 1992. Esta raça originária da França está atualmente bem adaptada às condições de clima e alimentação do sul do Brasil. Uma fêmea Lacaune pode produzir 4,5 litros de leite/dia no pico da lactação, que ocorre ao redor dos 30 dias pós-parto, durando o período de lactação aproximadamente 150 dias (BRITO *et al.*, 2006).

A produção de leite ovino em escala comercial iniciou na década de 1960, na Austrália. Estima-se que 45 estabelecimentos de produção de leite ovino tenham iniciado neste período, mas somente oito estejam em funcionamento atualmente (STUBBS *et al.*, 2009).

A produção e o processamento industrial de leite de ovelhas ainda são muito pequenos no Brasil. A cadeia ovina brasileira está focada na produção de carne e lã, já que os produtos lácteos de animais ruminantes são considerados caros (NESPOLO *et al.*, 2010).

A utilização de leite de ovelha pressupõe uma matéria-prima com teor maior de extrato seco, em relação ao leite de vaca, sendo que os teores de

proteína, gordura, umidade, cinzas e acidez são parâmetros de qualidade a serem observados (STUBBS *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2007).

O leite de ovelha contém quase o dobro de sólidos totais que o leite de vaca. O rendimento industrial chega a 18-25%, ou seja, são necessários apenas 4-5 kg de leite de ovelha para a produção de 1 kg de queijo. O maior conteúdo e variedade de tipos de caseína favorece esse maior rendimento, pois reduzem o tempo de coagulação da massa e o coágulo é mais firme quando comparado à produção de queijo com leite de vaca (BERGER, 2005).

A composição média do leite de ovelha é de 7,6% de gordura, 5,6% de proteína, 19,0% de sólidos totais, 10,3% de sólidos desengordurados, 4,7% de lactose e 4,6% de caseína. Essa característica lhe confere a capacidade de ser transformado em produtos lácteos de alta qualidade com altos rendimentos por litro de leite (RIBEIRO *et al.*, 2007).

O leite de ovelha possui propriedades nutricionais únicas em sua composição e que podem ser utilizadas em mercados específicos. Por exemplo, apresenta as vitaminas A, B e E, e os minerais cálcio, fósforo, potássio e magnésio em níveis mais elevados do que os encontrados no leite de vaca (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2007a). O leite ovino proporciona algum alívio para quem apresenta intolerância as proteínas do leite de vaca. Apesar das qualidades nutricionais, apenas pequenas quantidades de leite de ovelha são consumidas como leite fluido.

Na Espanha, por exemplo, 7,2% do leite de ovelha é consumido como leite fluido. Isto é certamente devido ao fato de que a maioria do leite de ovelha é produzido em países onde o consumo de leite fluido sempre foi

tradicionalmente baixo. Além disso, com o alto teor de sólidos no leite de ovelha, é mais facilmente aceito para fabricação de produtos lácteos semi-sólido ou sólidos, por exemplo, iogurte ou queijo. No entanto, na Grã-Bretanha, uma grande parte da produção de leite de ovelha é consumida como leite fluido. O leite é pasteurizado e armazenado em recipientes de embalagem ½ litro. O leite é, então, em geral, congelado e vendido para lojas de alimentos (BERGER, 2005).

Quantitativa e qualitativamente, as proteínas constituem a fração mais importante do leite. Dois tipos de proteínas podem ser encontradas no leite: as caseínas e as proteínas do soro. No leite de ovelha, a caseína corresponde a 80% das proteínas totais. O leite de ovelha contém quase o dobro de extrato seco do que o leite bovino, bem como maior teor de gordura e caseína (JANDAL, 1996). Devido a um maior teor de caseína, o leite ovino possui melhores propriedades de coagulação e melhor potencial para a produção de queijo quando comparado ao leite de vaca (BERGER, 2005).

Tabela 1- Comparativo da composição nutricional dos leites de ovelha, vaca e cabra (valores por 100 mL)

Nutriente	Ovelha	Cabra	Vaca
Energia (Kcal)	107,0	68,8	61,4
Proteínas (g)	6,0	3,6	3,3
Lipídios (g)	7,0	4,1	3,3
Carboidratos (g)	5,4	4,4	4,7
Cálcio (mg)	193,4	133,5	119,4
Ferro (mg)	0,1	0,05	0,05
Fósforo (mg)	158,0	110,7	93,4
Vitamina (mg)	4,6	1,3	0,9

Fonte: USDA (1999) citado por Aginsky (2005).

O leite de ovelha é um produto único com alta qualidade nutricional que contém mais ácidos graxos de cadeia curta, mais proteína, mais cálcio e mais

vitaminas que o leite de vaca. É reconhecido por muitas pessoas como não alergênico e que poderia abrir as portas para um mercado de leite fluido. É um excelente produto para a fabricação de iogurtes e queijos, resultando no dobro do rendimento de queijo do que o leite de vaca. A composição do soro poderia permitir a fabricação de uma vasta gama de produtos derivados, o que melhoraria o retorno financeiro do produtor de queijo (BERGER, 2005).

2.3 CASEINAS E CASEINATOS

As caseínas são uma família de fosfoproteínas sintetizadas pelas glândulas mamárias e secretadas como agregados coloidais grandes chamados micelas (MC), que são responsáveis por muitas propriedades únicas deste alimento e os principais compostos protéicos do leite (PITKOWSKI *et al.*, 2008; GINGER & GRIGOR, 1999), representando em torno de 80% do total das proteínas lácteas (FOX & BRODKORB, 2008; BRAGA *et al.*, 2006; WEST, 1986).

No leite, quase todas as caseínas (CN) presentes encontram-se formando parte de micelas mais ou menos esféricas, que compreendem de 20 a 150.000 moléculas de CN (peso molecular médio de $2,5 \times 10^8$ g mol⁻¹) (PITKOWSKI *et al.*, 2008; MCGANN *et al.*, 1980). As MC possuem um alto conteúdo de material inorgânico (7g/100g CN) formado principalmente por íons cálcio e fosfato e estão altamente hidratadas (3,7g H₂O/g CN). Porém somente uma pequena parte desta água está unida às caseínas (0,5g H₂O/g CN), o restante está encerrado dentro da micela (ALVAREZ *et al.*, 2007; KOROLCZUK, 1981). Este grau de hidratação das MC faz com que seu diâmetro médio varie de 80 a 680 nm (RISSO *et al.*, 2007). A estrutura da

micela de caseína é similar em leite de ovelha, de cabra e de vaca, mas difere na composição, tamanho e hidratação (PARK, 2007).

As caseínas incluem quatro tipos de cadeias polipeptídicas principais chamadas α S1-CN, α S2-CN, β -CN e κ -CN, além de alguns derivados formados por proteólise destas moléculas (ALVAREZ *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2006; WEST, 1986).

As principais cadeias de caseínas são as mesmas no leite ovino, caprino e bovino, sendo que o leite caprino possui menos proteínas e caseínas que o leite ovino. Comparando com as caseínas ovinas, as caseínas caprinas contêm menos α S (α S1 e α S2) e mais β e κ -CN. O leite caprino também possui maior proporção de nitrogênio não protéico, em relação ao ovino (RAYNALLJUTOVAC *et al.*, 2007a).

Todas as cadeias de caseínas têm em comum a presença de, ao menos, um grupo fosfato por molécula, esterificado a resíduos de serina e ocasionalmente a treonina (ligação éster-fosfato), característica que nenhuma das proteínas do soro possui (WEST, 1986).

A caseína comercial, produzida por meio da precipitação ácida, é uma das principais proteínas com funcionalidade tecnológica em alimentos (SABADINI *et al.*, 2006; ROMAN & SGARBIERI, 2005).

Os métodos tradicionais de fabricação de caseína promovem alterações químicas irreversíveis na estrutura da micela, por meio da acidificação ou modificação enzimática, a fim de facilitar a separação das proteínas coaguladas dos constituintes do soro (ROMAN & SGARBIERI, 2005). São utilizados procedimentos adicionais de centrifugação a baixas temperaturas e

lavagem com solventes para garantir a remoção da gordura láctea residual (FERREIRA *et al.*, 2006). Os caseinatos podem ser preparados por subsequente elevação do pH e dissolução das caseínas precipitadas. São chamados caseinato de sódio ou caseinato de cálcio, dependendo da solução utilizada na neutralização: hidróxido de sódio ou de cálcio, respectivamente (ALVAREZ *et al.*, 2008; PITKOWSKI *et al.*, 2008; SABADINI *et al.*, 2006).

Caseínas e caseinatos são extensivamente usados na indústria alimentícia devido a suas propriedades físico-químicas, nutricionais e funcionais (PITKOWSKI *et al.*, 2008; ALVAREZ *et al.*, 2007; RUIS *et al.*, 2007; BRAGA *et al.*, 2006), sendo ingredientes utilizados na formulação de produtos cárneos, produtos lácteos, produtos de panificação, chocolates e confeitos, coberturas comestíveis, bebidas lácteas e achocolatados, salgadinhos e snacks, filmes comestíveis e impermeabilizantes (ROMAN & SGARBIERI, 2005). O caseinato de cálcio não é tão utilizado quanto o de sódio, devido à sua limitada solubilidade (PITKOWSKI *et al.*, 2008).

2.4 SORO

O soro lácteo é o subproduto da indústria de transformação do leite em queijo ou da produção de caseínas, sendo habitualmente designado por soro de queijo. Numa primeira aproximação, pode considerar-se o soro lácteo como leite sem caseínas nem matéria gorda (DAUFIN *et al.*, 1998).

Este produto contém cerca de 65 g de extrato seco (sólidos totais) por litro, sendo o restante água. Os principais componentes do seu extrato seco são a lactose (70-80%), proteínas (9%, que corresponde a 20% das proteínas

do leite) e minerais (8-20%) (DAUFIN *et al.*, 1998), podendo existir ainda, em menores proporções, outros componentes, tais como peptídeos hidrolisados da caseína, resultantes da fabricação do queijo, lipídios, bactérias, etc. (DAUFIN *et al.*, 1998; WALSTRA *et al.*, 2001).

A composição e o tipo de soro dependem dos tipos de queijos fabricados e dos processos tecnológicos utilizados na sua produção. Basicamente, há dois tipos de soro de queijo: soro doce e soro ácido. O soro doce resulta da manufatura de queijos feitos com leites coagulados inicialmente por renina (por exemplo, queijos “cheddar”, suíço e mussarela), tendo pH de 5,9 a 6,7; o soro ácido é gerado na fabricação de caseína ou de queijos frescos (coagulados por ácido), tendo pH de 4,4 a 4,8. Os soros ácidos possuem maior conteúdo de cinzas e menor concentração de proteínas, tendo utilização mais limitada devido ao sabor ácido e ao alto conteúdo salino (RICHARDS, 1997; PONSANO *et al.*, 1992; GONSÁLEZ SISO, 1996).

O reconhecimento do valor nutricional do soro lácteo, principalmente devido às excelentes propriedades nutricionais, biológicas e funcionais das suas proteínas (HAMBRAEUS, 1984; KINSELLA e WHITEHEAD, 1989; MORR e HA, 1993; MAUBOIS e LÉONIL, 1989), assim como a necessidade de resolver o problema do impacto ambiental, causado pela produção de volumes elevados deste produto, o qual possui uma carga orgânica alta (com valores da carência bioquímica de oxigênio, determinados a 20 °C e ao fim de 5 dias, que variam entre 30 a 50 g L⁻¹, segundo DAUFIN *et al.*, 1998), fez com que, a partir dos anos sessenta, com o desenvolvimento de tecnologias, se abrissem novos horizontes para valorização deste produto.

E de fato, a partir desta data surgiu uma grande variedade de novos produtos, extensivamente usados por várias indústrias, nomeadamente a indústria alimentar (DAUFIN *et al.*, 1998; HORTON, 1995; ZYDNEY, 1998; CHERYAN, 1998). Além disso, investigações recentes têm permitido concluir que as proteínas do soro podem também ser usadas com fins terapêuticos, como por exemplo como antioxidantes e anti-hipertensivos (BOUMBA *et al.*, 2001; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 2001; SINHA *et al.*, 2007).

Apesar do seu elevado valor nutricional, o emprego do soro *in natura* é limitado, em virtude das características perecíveis e da alta diluição dos seus componentes. Deste modo, várias tecnologias têm sido utilizadas visando agregar valor a esta matéria-prima. Assim, a concentração do soro pode ser realizada por procedimentos que envolvam o aquecimento e a secagem (evaporação, "spray-drier", liofilização) ou por osmose reversa, enquanto que a desmineralização pode ser feita por resinas de troca iônica ou eletrodialise. As tecnologias de separação por membranas vêm sendo, igualmente, utilizadas para a obtenção de ingredientes protéicos a partir do soro de leite (BRANS *et al.*, 2004).

No mercado brasileiro de laticínios, a produção de bebidas lácteas é uma das principais opções de aproveitamento do soro, devido a simplicidade do processo e a possibilidade de uso de equipamentos já existentes na usina de beneficiamento de leite, reduzindo custos. As mais comercializadas são as bebidas fermentadas com propriedades sensoriais semelhantes ao iogurte, contudo, o aproveitamento deste subproduto atinge apenas 15% do total de soro produzido no país (NEVES, 2001; SANTOS *et al.*, 2008).

As proteínas do soro de leite apresentam estrutura globular com algumas ligações dissulfeto, proporcionando certo grau de estabilidade estrutural. Elas correspondem a aproximadamente 20% do conteúdo protéico do leite (JOVANOVIC *et al.*, 2005), sendo as principais frações representadas pela β -lactoglobulina e α -lactalbumina. Outras proteínas ou peptídeos secundários estão presentes em concentrações menores, como imunoglobulinas, albumina, lisozima, lipase, lactoferrina e xantina oxidase (HARAGUCHI *et al.*, 2006).

Com relação ao valor nutricional, estas proteínas possuem, no seu conjunto, um perfil em aminoácidos próximo dos padrões de necessidades recomendados. São constituídas por alto teor de aminoácidos essenciais, sulfurados e com cadeia ramificada. Apresentam, ainda, boa digestibilidade, o que faz com que o seu valor biológico seja elevado quando comparado com outras proteínas alimentares (SINHA *et al.*, 2007).

A β -lactoglobulina (β -Lg) é considerada como a principal proteína do soro de leite, representando em torno de 50% do teor protéico total (JOVANOVIC *et al.*, 2005). É muito resistente à ação de ácidos e enzimas proteolíticas do estômago, sendo por isso considerada como um importante carreador de retinol (pró vitamina A) materno para o filhote, em animais. Esta função biológica é ausente em humanos, uma vez que a β -Lg não está presente no leite humano (HARAGUCHI *et al.*, 2006).

Outra importante proteína do soro é a α -lactalbumina (α -La), que é rica em aminoácidos essenciais, como a lisina, leucina, treonina, triptofano e cistina (JOVANOVIC *et al.*, 2005). Suas funções estão relacionadas com a síntese de

lactose (SGARBIERI, 2004) e com a atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas (HARAGUCHI *et al.*, 2006).

As proteínas do leite podem ser classificadas em dois grupos: as caseínas e as proteínas do soro. As caseínas se encontram em suspensão no leite na forma de micelas, que são agrupamentos de várias moléculas de caseína ligadas a íons como o fosfato de cálcio (SGARBIERI, 1996).

Normalmente, esta proteína permanece estável durante a pasteurização, entretanto, quando o leite sofre acidificação, como no caso da produção de alguns queijos, ocorre desestruturação das micelas e conseqüentemente formação de coágulo. As proteínas do soro do leite apresentam estrutura globular e permanecem em solução. Diferentemente das caseínas, estas são insensíveis às coagulações ácidas. Portanto, quando ocorre a coagulação das caseínas com a gordura formando coalho, as proteínas do soro e boa parte da lactose permanecem em solução (SGARBIERI, 1996).

2.5 COMPOSTOS BIOATIVOS

Compostos bioativos são constituintes extranutricionais e ocorrem tipicamente em pequenas quantidades nos alimentos. Para ser considerado bioativo, o componente da dieta deve exercer um efeito biológico a um nível fisiologicamente realista e a bioatividade medida deverá ter potencial de afetar a saúde de maneira benéfica (MÖLLER *et al.*, 2008).

A importância das proteínas na dieta tem sido cada vez mais reconhecida, como resultado das novas descobertas científicas no campo de nutrição durante as últimas duas décadas. O valor de proteínas como uma fonte essencial de aminoácidos é bem documentada,

mas recentemente tem sido reconhecido que as proteínas da dieta exercem muitas outras funcionalidades *in vivo* por meio de peptídeos biologicamente ativos. Esses peptídeos são inativos dentro da seqüência da proteína e são liberados pelas enzimas digestivas durante o trânsito gastrintestinal. Neste contexto, peptídeos bioativos têm sido definidos como fragmentos de proteínas específicas, que apresentam um impacto positivo sobre as funções do organismo, influenciando de forma benéfica a saúde (KITTS & WEILER, 2003).

Peptídeos biologicamente ativos podem ser produzidos das seguintes maneiras: (a) hidrólise enzimática por enzimas digestivas, (b) fermentação do leite com culturas iniciadoras (*starters*), (c) proteólise por enzimas derivadas de microrganismos ou plantas. A maneira mais comum para a produção de peptídeos bioativos é através da hidrólise enzimática de proteínas nativas (MÖLLER *et al.*, 2008).

As proteínas do leite são consideradas a fonte mais importante de peptídeos bioativos. Um grande número de estudos têm demonstrado que a hidrólise das proteínas do leite por proteases pode resultar na produção de peptídeos biologicamente ativos (KORHONEN and PIHLANTO, 2006). Enzimas do trato gastrintestinal, tais como pepsina e tripsina, bem como enzimas de bactérias e fungos, vêm sendo utilizadas na produção de peptídeos bioativos a partir de várias proteínas (FITZGERALD, MURRAY, & WALSH, 2004; KILARA & PANYAM, 2003).

A produção e as propriedades de peptídeos bioativos derivados das proteínas do leite são extensamente revisadas pela literatura (CLARE & SWAISGOOD, 2000; KORHONEN & PIHLANTO, 2003; PIHLANTO &

KORHONEN, 2003; MEISEL, 2005; SILVA & MALCATA, 2005; KORHONEN & PIHLANTO, 2006, 2007a).

2.5.1 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Uma gama de peptídeos bioativos pode ser liberada de caseínas e proteínas do soro, mas somente uma pequena parte destes peptídeos tem sido identificada e caracterizada com respeito à atividade antimicrobiana (BENKERROUM, 2010). Peptídeos antibacterianos foram identificados, por exemplo, a partir da α_{S1} -caseína e α_{S2} -caseína (RIZELLO *et al.*, 2005; MCCANN *et al.*, 2006). Peptídeos antimicrobianos podem apresentar amplo espectro de ação, atuando contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*Escherichia*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Salmonella* e *Staphylococcus*), leveduras e fungos filamentosos.

Proteínas do soro (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, albumina sérica, imunoglobulinas, lactoferrina, lisozima, entre outras) são conhecidas fontes de peptídeos bioativos com propriedades de promoção à saúde ou antimicrobianas. Entre elas, lactoferrina e lisozima possuem atividades antimicrobianas inerentes e também liberam fragmentos protéicos pela digestão proteolítica (BENKERROUM, 2010). Neste sentido, os peptídeos antimicrobianos mais estudados são as lactoferrinas, que são derivados de lactoferrina bovina e humana (KITTS & WEILER, 2003).

A importância fisiológica dos peptídeos antimicrobianos do leite continua a ser estabelecida, embora tenham sugerido que eles possam modular a microflora intestinal, quando formados durante a digestão do leite “*in vivo*”

(SHIMIZU, 2004). Por outro lado, estes peptídeos podem encontrar aplicações interessantes no campo de segurança alimentar e produtos farmacêuticos (KORHONEN & PIHLANTO, 2006).

Os mecanismos pelos quais os peptídeos antimicrobianos agem sobre as bactérias sensíveis são importantes, mas pouco estudados e permitiriam desenvolver novas moléculas com espectro de ação maior ou elevar a atividade antimicrobiana de peptídeos conhecidos (GOBBETTI *et al.* 2004; BENKERROUM, 2010)

De uma forma geral, os peptídeos primeiramente atuam na membrana plasmática através do estabelecimento de uma ligação eletrostática entre o peptídeo (setores catiônicos) e os componentes da membrana (grupos fosfato carregados negativamente) (GOBBETTI *et al.* 2004; BENKERROUM, 2010) .

Em paralelo, o caráter hidrofóbico de alguns peptídeos permite a interação com os lipídios da membrana. Tal interação resulta em formação de um canal transmembranar 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 (GOBBETTI *et al.* 2004; BENKERROUM, 2010).

No entanto, o alvo final não é sempre a membrana, já que o peptídeo pode transpor o citoplasma e agir sobre os componentes intracelulares, interferindo nas funções celulares ou causando a floculação do citoplasma (GOBBETTI *et al.* 2004; BENKERROUM, 2010).

2.5.2 PEPTÍDEOS ANTIOXIDANTES

A oxidação em alimentos é uma das principais causas de deterioração dos mesmos (ANTOLOVICH, PRENZLER, PATSALIDES, MCDONALD, & ROBARDS, 2002). Em carnes, os indicadores mais importantes para a degradação são as mudanças na cor, o crescimento microbiano e a oxidação lipídica (LAUZURICA *et al.*, 2005). A oxidação afeta lipídios, proteínas e carboidratos. No entanto a oxidação lipídica é a principal causa da deterioração de alimentos, levando a encurtamento da vida útil (PHILANTO, 2006). Oxidação de proteínas em alimentos é influenciada pela oxidação lipídica, onde os produtos da oxidação lipídica reagem com as proteínas causando sua oxidação (VILJANEN, KIVIKARI, & HEINONEN, 2004). Carboidratos também são suscetíveis à oxidação, mas eles são menos sensíveis que lipídios e proteínas (PARKIN & DAMODARAN, 2003).

A oxidação de gorduras nos alimentos produz odor e gosto a ranço capaz de ser detectado pelo consumidor. Assim, a oxidação lipídica é a maior causa de perda de aroma, valor nutritivo e diminuição da vida útil de produtos contendo gordura. Com o intuito de diminuir este problema, antioxidantes sintéticos como butil-hidroxil tolueno (BHT) e butil-hidroxil anisole (BHA) têm sido amplamente utilizados na indústria alimentícia. Porém os efeitos adversos causados por estes compostos estimularam o uso de antioxidantes naturais tais como catequinas, tocoferóis, ascorbato, ácido rosmarínico e vários extratos fenólicos de plantas. A procura por antioxidantes naturais se estendeu para proteínas e peptídeos de origem animal e vegetal como proteínas de soja,

zeína, gérmen de trigo, albumina do ovo, proteínas lácteas (XUE *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2010).

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. Existem duas categorias básicas de antioxidantes denominadas de sintéticos e naturais (HALL III & CUPPETT, 1997).

No entanto, propriedades carcinogênicas e outros efeitos adversos têm sido atribuídos aos antioxidantes sintéticos. Logo, atenção especial tem sido dada aos antioxidantes naturais, devido a uma tendência mundial para evitar ou minimizar o uso em alimentos de aditivos sintéticos (SHIH & DAIGLE, 2003; TRIPATHI, MOHAN, & KAMAT, 2007). O potencial de aplicação de diversos antioxidantes naturais, tais como catequinas, tocoferóis, ascorbato, ácido rosmarínico e vários extratos fenólicos de plantas vêm sendo pesquisados (CHEUNG *et al.*, 2003).

Peptídeos gerados a partir da digestão de diferentes proteínas são relatados como possuidores de atividades antioxidantes (CHEN, MURAMOTO, YAMAUCHI, & NOKIHARA, 1996). Logo, a procura por antioxidantes naturais se estendeu para proteínas e peptídeos de origem animal e vegetal, como proteínas de soja, zeína, gérmen de trigo, gelatina, albumina de ovo e proteínas lácteas (XUE *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2010).

Neste sentido, estudos são necessários para estabelecer relações entre a composição do peptídeo e a atividade antioxidante para o desenvolvimento de antioxidantes naturais.

2.5.3 PEPTÍDEOS ANTI-HIPERTENSIVOS

A hipertensão arterial é importante problema de saúde pública devido à alta prevalência e ao seu papel em doenças cardiovasculares como doença coronária, insuficiência cardíaca congestiva e acidente vascular cerebral (LIGNITTO *et al.*, 2010). O tratamento é realizado com diversos medicamentos sintéticos: β -bloqueadores, diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e bloqueadores de receptores da angiotensina II (TORRUCO-UCO *et al.*, 2008).

A enzima conversora de angiotensina (ECA) tem sido associada com o sistema renina-angiotensina, que regula a pressão sanguínea arterial. A inibição desta enzima pode exercer efeito anti-hipertensivo. Um grande número de peptídeos inibidores da ECA tem sido isolados através da digestão enzimática de várias proteínas do leite e são atualmente um grupo de peptídeos bioativos bastante estudados. Além da inibição da ECA, peptídeos do leite podem exercer efeitos anti-hipertensivos também através de outros mecanismos (MAES *et al.*, 2004).

Embora diferentes proteínas alimentares possam agir como precursoras de peptídeos inibidores da ECA, as proteínas lácteas são as mais importantes fontes. Peptídeos inibidores de ECA derivados da caseína são chamados de casoquininas e, aqueles derivados das proteínas do soro, de lactoquininas. A

inibição da ECA resulta em um efeito anti-hipertensivo e também pode influenciar diferentes sistemas regulatórios envolvidos na modulação da pressão arterial, defesa imune e atividade do sistema nervoso (PIHLANTO-LEPPÄLÄ *et al.*, 1998; PRIPP *et al.*, 2006; LIGNITTO *et al.*, 2010).

Peptídeos inibidores da ECA geralmente contem de 2-20 resíduos de aminoácidos, apesar de serem encontrados peptídeos ativos com até 27 aminoácidos (SAITO, NAKAMURA, KITAZAWA, KAWAI, & ITOH, 2000; YAMAMOTO, AKINO, & TAKANO, 1994).

Os peptídeos anti-hipertensivos derivados dos produtos lácteos não são tão potentes quanto as drogas comerciais (captopril, por exemplo) comumente usadas no tratamento da hipertensão; entretanto, os produtos com moderada bioatividade se comportam intrinsecamente (e naturalmente) como alimentos funcionais, e assim podem facilmente ser incluídos na alimentação diária (SILVA & MALCATA, 2005).

2.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS

A hidrólise de proteínas pode ser catalisada por ácidos, bases ou enzimas. As hidrólises ácida e alcalina são totalmente inespecíficas, podendo destruir aminoácidos como triptofano, lisina, treonina e causar a racemização da maioria dos aminoácidos, comprometendo o valor nutricional da proteína (ADLER-NISSEN, 1985).

A utilização de proteases específicas apresenta algumas vantagens sobre a hidrólise alcalina ou ácida, como a especificidade, o controle do grau de hidrólise, as condições moderadas de ação, o menor conteúdo de sal no

hidrolisado final e, ainda, a formação mínima de subprodutos (MANNHEIM & CHERYAN, 1992; PEARCE, 1995).

Além disto, como as enzimas podem ser empregadas, geralmente, em concentrações muito baixas, sua remoção do sistema da reação é frequentemente desnecessária e mais fácil do que para outros catalisadores, os quais devem ser usados em concentrações maiores (REED, 1975).

O processo de hidrólise enzimática tem se destacado na melhoria das propriedades funcionais das proteínas, como solubilidade, poder emulsificante, textura, tendo grande aplicabilidade em vários produtos alimentícios (ABERT & KNEIFEL, 1993; DUARTE *et al.*, 1998; SILVESTRE *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2003a,b,c; VIANA *et al.*, 2004, 2005; CAPOBIANGO *et al.*, 2006). As proteases têm sido utilizadas para a modificação de proteínas, como na hidrólise de soja e outros vegetais, para a solubilização de concentrados de peixes, amaciamento de carnes, hidrólise de caseína, na melhoria da textura de queijos, aumentando assim, significativamente, a qualidade e o valor nutritivo dos produtos (CHEFTEL *et al.*, 1989).

Além da melhoria das propriedades funcionais e organolépticas, é possível aumentar o aproveitamento nutricional das proteínas através do tratamento enzimático. Um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado para utilização dietética é sua distribuição quanto ao tamanho dos peptídeos, pois é sabido que o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção (GRIMBLE *et al.*, 1986; VIJAYALAKSHIMI *et al.*, 1986).

Diversos autores têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di- e tripeptídeos, são utilizadas mais

efetivamente pelo organismo do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou a proteína intacta, apresentando assim um maior valor nutritivo (KEOHANE *et al.*, 1985, GRIMBLE *et al.*, 1986; RÉRAT, 1993; BOZA *et al.*, 2000).

Uma desvantagem encontrada no processo de hidrólise enzimática é o desenvolvimento de sabor amargo no decorrer da catálise, o qual parece estar relacionado à liberação de grupamentos hidrofóbicos que se encontravam no interior das moléculas protéicas. Esta característica representa um dos principais obstáculos na aplicação generalizada dos hidrolisados (MINAGAWA *et al.*, 1989; SAHA & HAYASHI, 2001).

Entretanto, alguns procedimentos podem ser utilizados para o mascaramento do sabor amargo de hidrolisados protéicos, tais como adição de compostos para mascarar sabor, aplicação de cromatografia hidrofóbica, adsorção de peptídeos amargos, hidrólise com exopeptidases, adição de lactobacillus, formação de plasteína, tratamento com carvão ativado e extração com solventes orgânicos (SAHA & HAYASHI, 2001; MORAIS *et al.*, 2005).

A qualidade e as características finais do hidrolisado protéico dependem de vários fatores que devem ser controlados para se alcançar os resultados desejados, entre eles encontram-se a natureza e associação de enzimas, pH, temperatura, tempo de hidrólise, tipo e concentração de substrato, relação enzima / substrato, inativação enzimática ao final do processo (ADLER NISSEN, 1981; CHOBERT *et al.*, 1988a,b; SILVESTRE *et al.*, 1994a,b CÂNDIDO, 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo estão apresentados sob a forma de três artigos científicos. Os referidos artigos são apresentados nas Seções 3.1 a 3.3, e identificados como Resultados I a Resultados III, respectivamente.

O primeiro artigo (Seção 3.1), que versa sobre atividades biológicas de caseinato ovino, tem como título “Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease”.

No segundo artigo (Seção 3.2), “Antioxidant properties and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of sheep cheese whey hydrolysates”, são apresentadas as propriedades antioxidantes e anti-hipertensiva do soro de queijo ovino.

O terceiro artigo (Seção 3.3) trata da purificação e identificação dos possíveis peptídeos responsáveis pelas atividades antioxidantes e anti-hipertensiva dos hidrolisados de soro de queijo ovino e caseinato ovino.

RESULTADOS I

Research Article



Received: 18 January 2011

Revised: 21 March 2011

Accepted: 24 March 2011

Published online in Wiley Online Library:

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.4446

Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease

Ana Paula F Corrêa,^a Daniel J Daroit,^a Julise Coelho,^a Stela MM Meira,^a Fernanda C Lopes,^a Jéferson Segalin,^b Patrícia H Rizzo^c and Adriano Brandelli^{a*}

Abstract

BACKGROUND: Bioactive peptides might be released from precursor proteins through enzymatic hydrolysis. These molecules could be potentially employed in health and food products. In this investigation, ovine milk caseinate hydrolysates obtained with a novel microbial protease derived from *Bacillus* sp. P7 were evaluated for antioxidant, antimicrobial, and angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activities.

RESULTS: Antioxidant activity measured by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid method increased with hydrolysis time up to 2 h, remaining stable for up to 4 h. Hydrolysates showed low 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging abilities, with higher activity (31%) reached after 1 h of hydrolysis. Fe²⁺-chelating ability was maximum for 0.5 h hydrolysates (83.3%), decreasing thereafter; and the higher reducing power was observed after 1 h of hydrolysis. ACE-inhibitory activity was observed to increase up to 2 h of hydrolysis (94% of inhibition), declining afterwards. 3 h hydrolysates were shown to inhibit the growth of *Bacillus cereus*, *Corynebacterium fimi*, *Aspergillus fumigatus*, and *Penicillium expansum*.

CONCLUSION: Ovine caseinate hydrolyzed with *Bacillus* sp. P7 protease presented antioxidant, antihypertensive, and antimicrobial activities. Hydrolysis time was observed to affect the evaluated bioactivities. Such hydrolysates might have potential applications in the food industry.

© 2011 Society of Chemical Industry

Keywords: protein hydrolysates; bioactive peptides; antioxidant activity; antihypertensive activity; antimicrobial activity

INTRODUCTION

The consumer preference for slightly processed foods, concern in use of synthetic compounds and chemical additives, and increasing knowledge of the connection between diet and health raise the demand for natural and functional food ingredients, nutraceuticals, and dietary supplements. Food proteins, besides their nutritional roles, contain peptide sequences encrypted in their primary structures that are capable of modulating specific physiological functions. These protein fragments, termed bioactive peptides, are inactive within the sequence of the precursor protein, and could be released through enzymatic hydrolysis *in vivo* or *in vitro*. After release, they might exert opioid, antihypertensive, immunomodulatory, antibacterial, and antioxidant activities, among others, with potential applications in food science, technology, and nutrition.^{1–4}

Milk proteins are considered important sources of bioactive peptides that could be released through enzymatic hydrolysis by digestive (gastrointestinal) enzymes, by fermentation, and by proteolysis employing enzymes derived from microorganisms or plants.^{4,5} These proteins, mainly caseins, are commercially available in large amounts at a high degree of purity and at low price which, from a technological aspect, make them attractive in the search for bioactive peptides.² Therefore, the properties

of milk protein-derived bioactive peptides have been thoroughly investigated, and an increasing number of such molecules have been identified in milk protein hydrolysates and also fermented dairy products.^{6,7} Investigations usually report the production of biologically active peptides through the hydrolysis of caseins isolated from bovine milk. However, milk caseins from different species (sheep and goat, for instance), and the high genetic variability of milk proteins, might originate different bioactive peptides.^{8,9}

* Correspondence to: Adriano Brandelli, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: abrand@ufrgs.br

a Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

b Unidade Química de Proteínas e Espectrometria de Massas, Centro de Biotecnologia, UFRGS, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

c Departamento de Química-Física, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, S2002LRK Rosario, Argentina

The most common way to generate bioactive peptides is through enzymatic hydrolysis of whole protein molecules, and the bioactivity of such hydrolysis-generated peptides appears to be inherent to size and specific amino acid sequences.^{2,5} Proteolytic enzymes from various sources (animal, plant, microbial) have been successfully employed in the production of these molecules.^{6,7} As microorganisms could be cultured through well-established methods, producing high amounts of enzyme, microbial proteases appear as attractive biocatalysts to obtain protein hydrolysates and bioactive peptides on a commercial scale. In this sense, investigation of novel protease is required to obtain protein hydrolysates with desired properties. The keratinolytic bacterium *Bacillus* sp. P7 was previously shown to produce biotechnologically relevant extracellular proteases.¹⁰ In the current study, a protease preparation from this strain was employed in the hydrolysis of sodium caseinate obtained from ovine milk, and the biological activities (antioxidant, antihypertensive, and antimicrobial) of the protein hydrolysates were assessed, aiming to evaluate its potential for food applications.

EXPERIMENTAL

Microorganism and protease production

Bacillus sp. P7, utilized as protease producer, was maintained in Brain-Heart Infusion (BHI) agar plates. For protease production, the strain was cultivated in feather meal broth (10 g L⁻¹ feather meal, 0.3 g L⁻¹ Na₂HPO₄, 0.4 g L⁻¹ NaH₂PO₄, 0.5 g L⁻¹ NaCl) for 48 h at 30 °C in a rotary shaker (125 rpm).¹⁰ Culture was centrifuged (10 000 × *g* for 15 min at 4 °C) and the supernatant was submitted to a partial purification protocol.

Proteolytic activity assay

Proteolytic activity was determined as described elsewhere,¹⁰ using azocasein (Sigma Co., St Louis, MO, USA) as substrate. Briefly, the reaction mixture contained 100 µL enzyme preparation, 100 µL of 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl buffer (pH 8.0), and 100 µL of 10 mg mL⁻¹ azocasein in 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl buffer. The mixture was incubated at 37 °C for 30 min, and the reaction was stopped by adding 500 µL of 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA). After centrifugation (10 000 × *g* for 5 min), 800 µL of the supernatant was mixed with 200 µL of 1.8 mol L⁻¹ NaOH, and the absorbance at 420 nm was measured. One unit of enzyme activity was considered as the amount of enzyme that caused a change of 0.01 absorbance units under the above assay conditions.

Protease partial purification

The protease was precipitated from culture supernatants by the gradual addition of solid ammonium sulfate to achieve 60% saturation, in an ice bath with gentle stirring. This mixture was allowed to stand for 1 h, centrifuged (10 000 × *g* for 15 min at 4 °C), and the resulting pellet was dissolved in 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl buffer (pH 8.0). The concentrated enzyme samples were applied to a Sephadex G-100 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) gel filtration column (25 × 0.5 cm), previously equilibrated with Tris-HCl buffer (20 mmol L⁻¹, pH 8.0). Elution was carried out using the same buffer with a flow rate of 0.33 mL min⁻¹, and 30 fractions of 1 mL were collected. Fractions showing proteolytic activity were pooled and employed as protease preparation in protein hydrolysis. After this procedure, a 3.6-fold purification factor was obtained, with a specific activity of 1600 U mg⁻¹ protein.¹⁰

Preparation of ovine milk caseinate

The procedure was followed for the preparation of ovine caseinate from milk of Lacaune breed sheep from southern Brazil. After centrifugation at 10 000 × *g* for 10 min at 4 °C, the skim milk was acidified to pH 4.5 with 1 mol L⁻¹ acetic acid under continuous stirring at 25 °C. After 30 min at 40 °C, the mixture was filtered through Whatman no. 40 filter paper using a vacuum pump. The precipitated casein was washed with distilled water, dissolved with the addition of 10 g L⁻¹ NaOH until it reached pH 7.0, and precipitated again. Four successive cycles of precipitation and washing were carried out.¹¹ The final precipitate was washed with acetone and chloroform, if necessary, to remove residual fat globules.

Hydrolysis of ovine caseinate

Protein hydrolysates were prepared from the sodium caseinate obtained from ovine milk. Ovine caseinate (10 g L⁻¹) was first dissolved in 0.1 mol L⁻¹ NaOH, then in 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl buffer (pH 8.0), and preheated to 45 °C for 15 min. The hydrolysis, started by adding P7 protease preparation (2%, v/v), was carried out at 45 °C in a water bath with reciprocal shaking. Duplicate samples were withdrawn at defined intervals (0, 0.5, 1, 2, 3, or 4 h), and the hydrolysis reaction was stopped by heating at 100 °C for 15 min. After cooling, hydrolysates were centrifuged (10 000 × *g* for 15 min) to remove insoluble materials, and the supernatants were then lyophilized and kept at -18 °C until further analysis.

Degree of hydrolysis (DH)

DH, considered as the percentage of peptide bonds cleaved, was determined by the measurement of free amino groups following reaction with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), as previously described.¹² Briefly, samples (250 µL) were mixed with 2 mL phosphate buffer (0.212 mol L⁻¹; pH 8.2) and 2 mL of a 10 mg mL⁻¹ TNBS solution, and incubated at 50 °C for 1 h. After this period, 4 mL of 0.1 mol L⁻¹ HCl was added, and the mixtures were allowed to stand for 30 min at room temperature before the absorbance at 340 nm was measured. The total number of amino groups was determined in a protein sample (10 mg) which was completely hydrolyzed in 4 mL of 6 mol L⁻¹ HCl at 110 °C for 24 h.

Determination of 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging activity

Experiments were carried out using the ABTS assay,¹³ which involves the generation of ABTS radical chromophore by the oxidation of ABTS with potassium persulfate. It is applicable for both hydrophilic and lipophilic compounds. The ABTS radical cation was produced by reacting 7 mmol L⁻¹ ABTS stock solution with 140 mmol L⁻¹ potassium persulfate (final concentration), and allowing the mixture to stand in the dark for at least 12 h at room temperature before use. For the assay, the ABTS^{•+} solution was diluted with 5 mmol L⁻¹ phosphate-buffered saline pH 7.0 (PBS) to an absorbance of 0.7 (±0.02) at 734 nm. A 10 µL of sample (15 mg mL⁻¹) was mixed with 1 mL diluted ABTS^{•+} solution and an absorbance (734 nm) reading was taken after 6 min. Trolox was also used as a reference standard. The percentage inhibition of absorbance at 734 nm was calculated and plotted as a function of the concentration of the reference antioxidant (Trolox).

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging assay

This method, performed as described by Brand-Williams *et al.*,¹⁴ is based on the capture of the DPPH radical by antioxidants,

producing a decrease in absorbance at 517 nm. The DPPH was used at a concentration of $60 \mu\text{mol L}^{-1}$, dissolved in methyl alcohol. The solution was homogenized and transferred to a dark glass bottle. The prepared solution was used only on the day of analysis. In the dark, aliquots of 0.1 mL sample (250 mg mL^{-1}) were transferred to test tubes with 3.9 mL radical DPPH ($60 \mu\text{mol L}^{-1}$ DPPH solution) and homogenized by shaking. After 45 min, the scavenging activity was measured spectrophotometrically by the decrease in absorbance at 517 nm. Likewise, these same proportions (0.1 mL distilled water and 3.9 mL DPPH radical) were used as a control. Methyl alcohol was used as a blank. The standard curve was performed using DPPH concentrations from 0 to $60 \mu\text{mol L}^{-1}$. The results were expressed as scavenging rate (%) = $[1 - (A/A_0)] \times 100$, where A is the absorbance of the test and A_0 is the absorbance of the blank.

Determination of metal chelating activity

The chelating activity of Fe^{2+} was measured using the method described by Chang *et al.*,¹⁵ with slight modifications. One milliliter of sample (3.5 mg mL^{-1}) was mixed with 3.7 mL distilled water and then the mixture was reacted with 0.1 mL of 2 mmol L^{-1} FeSO_4 (Fe^{2+}) and 0.2 mL of 5 mmol L^{-1} ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine). After 10 min the absorbance was read at 562 nm. One milliliter of distilled water, instead of sample, was used as a control. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; 20 mg mL^{-1}) was used as standard. The results were expressed as: chelating activity (%) = $[1 - (A/A_0)] \times 100$, where A is the absorbance of the test and A_0 is the absorbance of the control.

Determination of reducing power

Reducing power of the hydrolysates was measured as previously described.¹⁶ Samples (15 mg mL^{-1}) from each hydrolysis period were mixed with 2.5 mL phosphate buffer (0.2 mol L^{-1} , pH 6.6) and 2.5 mL potassium ferricyanide (10 mg mL^{-1}), and then the mixture was incubated at 50°C for 20 min. Then, 2.5 mL TCA (10%, v/w) was added and the mixture was centrifuged ($3000 \times g$ for 10 min). The supernatant (1 mL) was mixed with 2.5 mL distilled water and 0.2 mL ferric chloride (1 mg mL^{-1}), and the absorbance was measured at 700 nm. Higher absorbance of the reaction mixture indicated greater reducing power. Butylated hydroxytoluene (BHT) at the same concentration of samples was used as a positive control.

Estimation of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity

Inhibition of ACE was assayed by the method of Cushman and Cheung,¹⁷ with some modifications. Each sample aliquot ($20 \mu\text{L}$; 15 mg mL^{-1}) was mixed with $200 \mu\text{L}$ buffered substrate solution (5 mmol L^{-1} hippuryl-histidyl-leucine in 50 mmol L^{-1} 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)-HCl buffer containing 300 mmol L^{-1} NaCl, pH 8.3, 37°C). After adding $40 \mu\text{L}$ ACE reagent to this suspension, the reaction mixture was further incubated at 37°C for 30 min, and was finished with $150 \mu\text{L}$ of 1 mol L^{-1} HCl. Then, the hippuric acid released was extracted with 1 mL ethyl acetate, and the organic phase was transferred to a glass tube to be heat evaporated. The residue was dissolved with $800 \mu\text{L}$ distilled water and measured spectrophotometrically at 228 nm. The ACE-inhibitory activity was expressed as a percentage: % of inhibitory activity = $(A - B)/(A - C) \times 100$, where A is the absorbance without sample, B is the absorbance without ACE, and C is absorbance in the presence of both ACE and sample.

Determination of antibacterial activity

Antibacterial activity was determined according to Motta and Brandelli,¹⁸ with modifications. The indicator strains tested were *Listeria monocytogenes* ATCC 15 131, *Bacillus cereus* ATCC 9634, *Corynebacterium fimi* NCTC 7547, *Staphylococcus aureus* ATCC 1901, *Salmonella enteritidis* ATCC 13 076, and *Escherichia coli* ATCC 8739. Indicator microorganisms, at a concentration of 10^8 CFU mL^{-1} in saline solution (0.85% NaCl, w/v), were inoculated with a swab onto BHI agar plates. Aliquots of $15 \mu\text{L}$ ovine caseinate hydrolysates (250 mg mL^{-1}) were spotted on the freshly prepared lawn of indicator strain, and plates were incubated at the optimal temperature for each test microorganism. Subsequently, zones of growth inhibition (represented by clear haloes) were measured and presented as inhibition zone (mm).

Determination of antifungal activity

To determine the antifungal activity of the hydrolysates, the filamentous fungi *Fusarium oxysporum* ssp. *lycopersici*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium expansum*, and the yeast *Candida tropicalis* were utilized as indicators. The fungi were cultivated in Potato Dextrose Agar (PDA) plates for 5 days at 30°C . Cell suspension of the yeast was prepared with the same method used for antibacterial activity determinations. Conidia suspensions of the filamentous fungi were prepared, and then added to PDA at 50°C in a sufficient volume to provide a final concentration of 10^6 conidia mL^{-1} . The medium was poured onto plates and, after solidification, $15 \mu\text{L}$ of the hydrolysates (250 mg mL^{-1}) were spotted. The plates were incubated at 30°C for 48 h and subsequently observed for inhibitory activity against the fungal indicator.

Mass spectrometry

Mass spectrometric experiments were carried out using a Micro-mass/Waters Q-TOF micro (Milford, MA, USA). The instrument was equipped with a nano-electrospray ionization (nano-ESI) source. The sample was dissolved in a 1:1 water-acetonitrile solution containing 0.1% formic acid. The hybrid mass spectrometer instrumental conditions were: positive ion mode; nano-ESI flow rate $0.6 \mu\text{L min}^{-1}$; sample cone voltage 40 V; capillary 3.3 kV; source temperature 100°C ; cone gas 5 L h^{-1} ; desolvation gas 30 L h^{-1} . The Q-TOF was calibrated using phosphoric acid 0.1% in water-acetonitrile (1:1). Data were analyzed with Waters MassLynx software. Mass spectra were processed using background subtraction followed by smoothing the spectrum with Savitzky-Golay smoothing, and measuring the peak top with a centroid top of 80%.

RESULTS AND DISCUSSION

Research efforts have been focused on the generation of bioactive peptides from a myriad of food sources, including milk and dairy products, egg, soy and meat, envisaging potential utilization by the food industry. In particular, investigations have been carried out to obtain bioactive peptides through the hydrolysis of bovine milk caseins.^{2,7,19} In the current study, the biological activities of ovine caseinate hydrolysates were investigated, on which there are relatively few studies in the literature.

The degree of hydrolysis (DH) measures the content of peptide bonds cleaved in the substrate by a proteolytic agent (proteases, in the current case): the higher the DH, the higher the content of released amino groups. DH is reported to affect the antioxidant activity of protein hydrolysates. Therefore, the biological activity

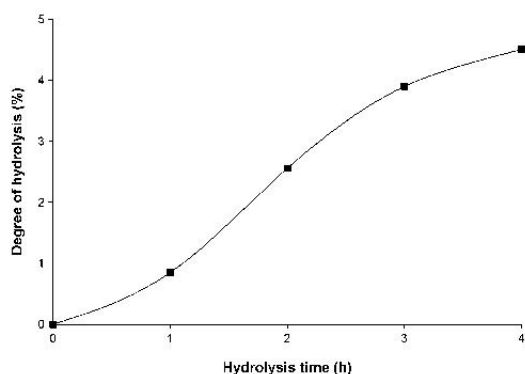


Figure 1. Degree of hydrolysis (DH, %) of ovine caseinate hydrolysates obtained with protease from *Bacillus* sp. P7.

of peptides depends on the protein substrate, enzyme specificity, and hydrolysis conditions.^{3,20,21} The progression in DH during the hydrolysis of ovine caseinate by protease P7 is shown in Fig. 1. The DH value increased during hydrolysis time, reaching 4.5% in 4 h, which is similar to DH of yak milk casein hydrolyzed by Alcalase (from *Bacillus licheniformis*) and Neutrase (from *Bacillus amyloliquefaciens*) for 4 h.²² In fact, the hydrolysis conditions of Neutrase (pH 7.0, 45 °C) closely resembled that employed in the current study (pH 8.0, 45 °C). The hydrolysis of α -casein from bovine milk with a protease from *Streptomyces griseus* at 37 °C for 2 h resulted in a DH of 4.2%,¹⁹ and the hydrolysis of whey protein concentrate with Neutrase (pH 7.0) or Alcalase (pH 8.0) at 45 °C for 3 h yielded hydrolysates with a DH of 5.6% and 11.3%, respectively.²³ In the current study, the DH after 4 h of hydrolysis had not increased significantly (data not shown). This profile suggests that the enzymes could not further hydrolyze the remaining bonds within the generated peptides, a fact that is directly influenced by enzyme specificity.

Peptides and protein hydrolysates, obtained from the proteolysis of various food proteins, are reported to possess antioxidant activities. Antioxidant mechanisms include radical-scavenging (both hydrogen-donating capability and free radical quenching) activity, inhibition of lipid peroxidation, metal ion chelation, or a combination of these properties.^{3,24} Antioxidant activities might protect biological systems against damage related to oxidative stress in human disease conditions. These antioxidant peptides and hydrolysates might also be employed in preventing oxidation reactions (such as lipid peroxidation) that leads to deterioration of foods and foodstuffs.^{20,21} Milk protein hydrolysates and

milk-derived peptides with antioxidant activity obtained by fermentation have also been investigated. Functional foods with such natural antioxidants are interesting since they can be potentially employed without the toxic side effects associated with the use of synthetic equivalents. Also, antioxidants from protein hydrolysates might confer nutritional value besides functional/physiological properties, which are additional advantages over the synthetic counterparts.^{25,26}

Scavenging activities of ovine caseinate hydrolysates were determined using two radicals: ABTS and DPPH. The radical ABTS is reduced with concomitant conversion to a colourless product in the presence of antioxidants with hydrogen-donating or chain-breaking properties. The hydrolysis of ovine caseinate with protease P7 for up to 2 h tended to enhance the antioxidant activity of hydrolysates measured by the ABTS assay; however, higher hydrolysis times have not increased radical scavenging (Table 1). From the analysis of antioxidant activities of ovine caseins, it was previously indicated that the primary structure as well as other factors, such as protein conformation, are important in exerting antioxidant activity.²⁵ The increased antioxidant activity through hydrolysis suggests that this process contributed to antioxidant activity by releasing previously inactive peptides encrypted in the sequence of ovine caseinate. Intact ovine casein, ovine casein fractions, and hydrolysates obtained by the sequential hydrolysis with pepsin, trypsin and chymotrypsin were also shown to possess antioxidant properties, as measured by the ABTS method.²⁵ In that study, the hydrolysates demonstrated a higher antioxidant activity than the non-hydrolyzed counterparts, as observed in the present investigation (Table 1). Also, peptides from water-soluble extracts of ovine and goat cheese-like systems showed antioxidant activity in the ABTS assay.²⁷ Previously, the antioxidant activity of whey protein hydrolysates with diverse proteases, evaluated by the ABTS assay, was positively correlated with DH.²³

DPPH is a free radical that accepts an electron or a hydrogen radical, becoming a stable molecule. For this reason, it is employed as a substrate to evaluate the antioxidant activity of peptides and protein hydrolysates. Results varied widely along with hydrolysis time (Table 1), and a relationship between hydrolysis time and DPPH activity could not be established; however, the higher DPPH-scavenging activity was evidenced after 1 h of hydrolysis. Proteolysis of food proteins is usually reported to enhance the DPPH-scavenging activity of hydrolysates.⁷ The DPPH-scavenging activity of yak milk protein hydrolysates obtained with Alcalase was observed to increase during the hydrolysis process for up to 7 h.²⁸ Nevertheless, this is not always observed.¹⁵ Specifically, bovine casein hydrolysates obtained with diverse proteolytic enzymes were shown to possess lower DPPH activity than the whole protein.²⁴ From the observed pattern of DPPH-scavenging

Table 1. Antioxidant activities of ovine caseinate hydrolysates^a

Hydrolysis time (h)	ABTS radical scavenging activity (%)	DPPH radical scavenging activity (%)	Fe ²⁺ -chelating ability (%)	Reducing power (Absorbance at 700 nm)
0	69.3 ± 0.14	27.5 ± 0.43	76.2 ± 0.018	0.607 ± 0.016
0.5	75.4 ± 1.43	20.7 ± 0.05	83.3 ± 0.002	0.755 ± 0.005
1	75.6 ± 0.51	30.9 ± 0.41	77.4 ± 0.007	1.094 ± 0.007
2	82.1 ± 1.45	23.4 ± 0.43	72.6 ± 0.055	0.824 ± 0.055
3	81.4 ± 1.21	27.9 ± 0.39	72.2 ± 0.072	0.780 ± 0.072
4	83.4 ± 0.75	20.9 ± 0.21	70.8 ± 0.003	0.487 ± 0.011

^a Values are the means ± SEM of three independent determinations.

activity, both hydrolyzed and non-hydrolyzed ovine caseinate contain some substances acting as electron donors that could react with free radicals, converting them into more stable molecules and terminating the radical chain reaction. However, protein hydrolysis has not presented a beneficial effect for the bioactivity evaluated in this assay. His, Phe, Tyr, Trp, among other aromatic and hydrophobic amino acids, seem to be involved in the antioxidant activity of protein hydrolysates.^{3,7,29}

The distinctive behaviour of protein hydrolysates in the ABTS and DPPH radical scavenging assays could be explained by the different stereoselectivity of the radicals, different peptides present in the sample capable of reacting and quenching different radicals, and by the different stoichiometry of reactions between the antioxidant compounds in hydrolysates and the ABTS and DPPH radicals.³⁰ Also, the antioxidant effect of caseins and casein-derived peptides is not fully based on the capability to donate hydrogen, and differences in scavenging efficacy can be attributed to solubility and diffusivity of radicals.²⁴ For instance, ABTS is a water-soluble radical monocation, and DPPH is an oil-soluble free radical. DPPH is pre-dissolved in methanol and may not easily diffuse to target peptides that are in aqueous solution, whereas ABTS could readily reach peptides in the aqueous solution assay. Therefore, a higher activity with the ABTS method does not necessarily implicate an increased ability to scavenge DPPH radicals. Another important consideration is that hydrolysate concentration in DPPH assays was much higher than that used in ABTS assays. In this perspective, the ABTS assay is one of the most effective and commonly used protocols to monitor antioxidant activities.²⁷

Iron acts as a catalyst for the generation of hydroxyl radicals through the Fenton reaction,²⁶ potentially contributing to diseases related to oxidative stress. Also, transition metals might stimulate lipid peroxidation in foods, resulting in rancidity.²¹ Consequently, chelating of metal ions might contribute to the antioxidant activity of protein hydrolysates. The metal ion-chelating action of casein and casein peptides has been reported,^{20,24} and the ferrous ion-chelating ability of the ovine caseinate hydrolysates is shown in Table 1. Ovine caseinate submitted to hydrolysis with protease P7 for 0.5 h exhibited 83.3% of Fe^{2+} chelating as compared to control hydrolysates (0 h; 76%), whereas longer hydrolysis times resulted in decreased metal chelation. A pea protein isolate hydrolyzed with thermolysin was observed to chelate 95% of the metal ions at 1 mg mL^{-1} ,²⁶ and a metal chelating activity of porcine hemoglobin hydrolysates (5 mg mL^{-1}) between 8% and 61% was observed, these values always being lower than for non-hydrolyzed hemoglobin.¹⁵ Therefore, whole and hydrolyzed ovine caseinate might have interfered with the formation of ferrous ion/ferrozine complex by capturing ferrous ions before ferrozine, suggesting that the antioxidant action could also be related to its iron-binding capacity.¹⁶ Proteins and peptides have metal-chelating abilities. Carboxyl and amino groups in branches of acidic and basic amino acids, respectively, might be involved in the chelation of Fe^{2+} and Cu^{2+} by peptides.²⁹ The presence of aromatic amino acids and hydrophobic amino acids in peptide fractions might also contribute to achieving a higher metal chelation activity.²⁶

The reducing power of ovine caseinate hydrolysates peaked after 1 h of hydrolysis, decreasing thereafter (Table 1). This assay is based on the ability of a compound to reduce the Fe^{3+} /ferricyanide complex to the ferrous form (Fe^{2+}). Consequently, the reducing ability of protein hydrolysates indicates that they could act as electron donors, reducing the oxidized intermediates of lipid

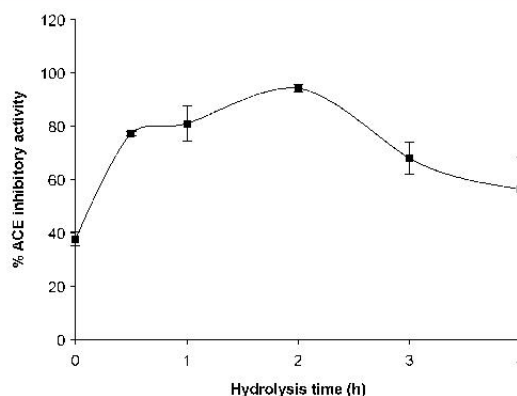


Figure 2. ACE-inhibitory activity of ovine milk caseinate hydrolysates obtained with protease P7. Values are the means \pm SEM of three independent determinations.

peroxidation processes, and suggesting that the reducing power likely contributes to the antioxidant activity.¹⁶ At a similar concentration, wheat germ protein isolates treated with Alcalase showed a reducing power comparable to that of 1 h hydrolysates of ovine caseinate.¹⁶ On the other hand, the proteolysis of porcine hemoglobin resulted in decreased reducing power compared to the intact protein.¹⁵

The renin-angiotensin system plays an important role in regulating arterial pressure. Within this system, ACE catalyzes the conversion of angiotensin I to angiotensin II, which is a potent vasoconstrictor; in addition, ACE degrades the vasodilator peptide bradykinin. Thus ACE inhibitors might potentially lower hypertension, and are believed to be useful in prevention and/or treatment of cardiovascular diseases.¹ Proteolytic enzymes have been successfully used to generate ACE-inhibitory peptides from food proteins, including caseins.^{19,22,31,32} The ACE-inhibitory activities of the ovine caseinate hydrolysates increased up to 2 h of hydrolysis with protease P7, decreasing afterwards (Fig. 2). Similar trends were reported for different protein hydrolysates, indicating that there is an optimal hydrolysis time or degree of hydrolysis and, as the hydrolysis time progressed, the ACE-inhibitory peptides were hydrolyzed to produce inactive peptides or amino acids.³² The 2 h hydrolysates inhibited 94% of the ACE activity, and 4 h hydrolysates demonstrated higher inhibitory activity when compared to non-hydrolyzed ovine caseinate (Fig. 2). The ACE-inhibitory activity of non-hydrolyzed yak milk casein was shown to be low (<5% inhibition), and protein hydrolysis with Neutrase and Alcalase resulted in the enhancement of ACE inhibition (around 70–80% inhibition), particularly in the first hour of hydrolysis, remaining stable at higher hydrolysis times.²² Sodium caseinates from bovine, sheep, goat, human, pig and buffalo milk, hydrolyzed for 48 h with a partially purified protease from *Lactobacillus helveticus* PR4, showed ACE-inhibitory activities of 2–43%.⁸ Bovine milk α -casein hydrolyzed with a bacterial protease showed approximately 60% ACE inhibition.¹⁹ Although structure-activity relationships of ACE-inhibitory peptides from milk proteins is not well defined, there are indications that peptide binding to ACE is influenced by the C-terminal tripeptide sequence of substrate or competitive inhibitors, preferring hydrophobic (aromatic or branched side chains) amino acid residues at each of the three C-terminal positions.²

Table 2. Antimicrobial activities of the 3 h ovine caseinate hydrolysate

Indicator microorganism	Inhibition zone (mm) ^a
Gram-positive bacteria	
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15 131	– ^b
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	9.3
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547	11.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1901	–
Gram-negative bacteria	
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13 076	–
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	–
Yeast	
<i>Candida albicans</i>	–
Filamentous fungi	
<i>Penicillium expansum</i>	9.0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10.0
<i>Fusarium oxysporum</i> ssp. <i>lycopersici</i>	–

^a Values for haloes are the means of three independent determinations.
^b Without inhibition.

The ability of ovine caseinate hydrolysates to inhibit the growth of many bacteria and fungi was then investigated. The results are shown in Table 2, and representative inhibition haloes are presented in Fig. 3. Ovine caseinate hydrolyzed for 3 h with the protease preparation from *Bacillus* sp. P7 showed antibacterial activity against *Bacillus cereus* and *Corynebacterium fimi* (Table 2). The inhibited bacteria, particularly *B. cereus*, are important causes of food poisoning and spoilage, and may also act as human opportunistic pathogens.³³ Hydrolysates obtained after the action

of chymotrypsin on bovine milk α -casein for 105 min were effective in retarding the growth of both Gram-positive (*B. cereus*) and Gram-negative (*E. coli*) bacteria.¹⁹ An antimicrobial peptide was obtained after the hydrolysis (48 h) of human sodium caseinate with *Lactobacillus helveticus* PR4, showing a wide spectrum of antimicrobial activity.⁸ Ovine α ₂-casein hydrolyzed for 30 min with pepsin demonstrated activity against various Gram-positive and Gram-negative bacteria.³⁴ Antimicrobial peptides derived from milk proteins usually possess an amphiphilic and cationic character, which appears to be significant for their mechanism of action, since it is proposed that electrostatic bonding between the peptides and the bacterial membranes (negatively charged) is the initial stage of the pore formation process leading to cell death.⁹ Since the rate of killing is higher than the rate of bacterial multiplication, this reduces the likelihood of microorganisms developing drug resistance.⁸

Milk protein-derived antimicrobial peptides usually show a broad range of activity against microorganisms of spoilage and/or health significance. However, from our results, only Gram-positive bacteria were inhibited (Table 2). As the cell envelope of Gram-negative bacteria is both structurally and functionally more complex than that of Gram-positive bacteria, these differences in bacterial membrane composition might have implications for the mode of action and the bacterial specificity of these antibacterial compounds.³⁵ Few investigations deal with the antifungal activity of peptides or protein hydrolysates. The most common fungal indicator is the yeast *Candida albicans*, and the utilization of filamentous fungi as test strain is scarcely reported.⁹ The fungi inhibited by the ovine caseinate hydrolysate (*Penicillium expansum* and *Aspergillus fumigatus*) may cause disease in humans and plants.³⁶ Therefore, the inhibition of filamentous fungi (Table 2) might represent an additional application as a novel antifungal agent. Antimicrobial peptides generated from food proteins

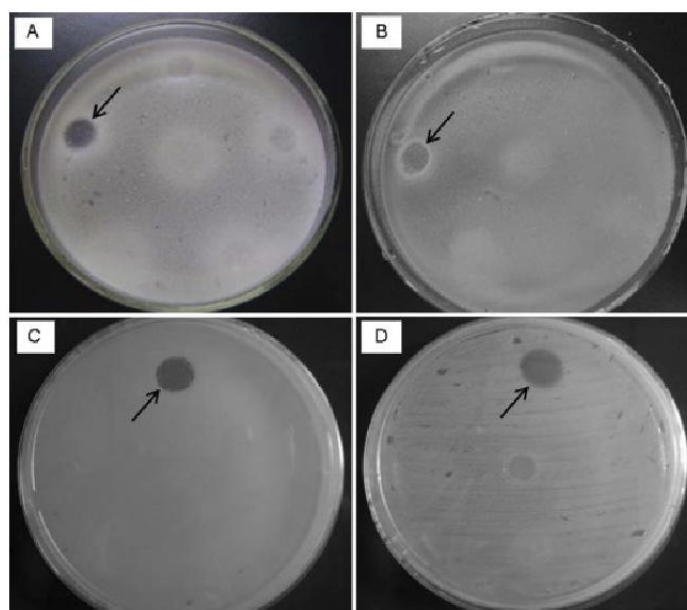


Figure 3. Growth inhibition of (A) *Aspergillus fumigatus*, (B) *Penicillium expansum*, (C) *Bacillus cereus* and (D) *Corynebacterium fimi* by the 3 h ovine caseinate hydrolysate. Arrows indicate inhibition haloes.

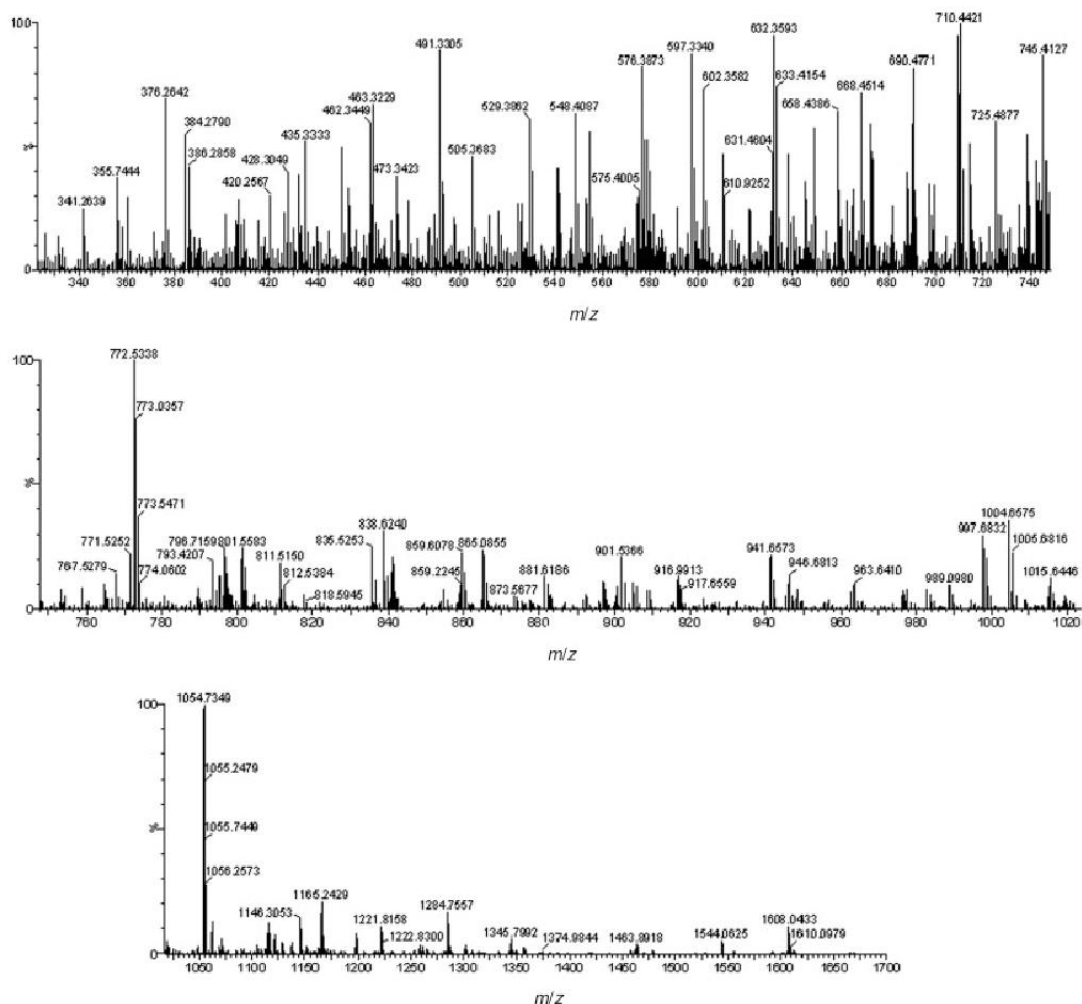


Figure 4. Mass spectrum of the 3 h ovine caseinate hydrolysate. Operation conditions are described in the Experimental section. The spectrum in the range m/z 300–1700 was separated into three sections for better visualization.

(particularly milk) present the great advantage of being produced from harmless and inexpensive sources. Hence there is a growing interest in the utilization of these peptides, for instance, as food-grade biopreservatives or as health-promoting food supplements in the food industry.^{2,9}

Bioactive peptides obtained from milk proteins commonly range from 2 to 20 amino acid residues, with a molecular mass of less than 2000 Da.^{5,31} The mass spectrum of the protein hydrolysate showing antimicrobial activity (3 h) is presented in Fig. 4. Milk protein hydrolysates are known to be highly complex mixtures that may contain up to hundreds of different peptides,²⁷ and comparisons with other casein hydrolysates are further complicated due to differences in protein substrates and enzyme specificities. However, some similar values were observed when comparing the ion m/z values obtained in the current study (Fig. 4) with those reported for bovine³¹ and ovine casein peptides.^{8,25} Efforts should be focused on the purification

and identification of bioactive peptides present in the protein hydrolysates.

CONCLUSIONS

Ovine caseinate hydrolysates presenting antioxidant, antihypertensive, and antimicrobial activities were produced through hydrolysis with a novel microbial protease preparation. The bioactivities presented by the protein hydrolysates could have resulted from the synergistic effect of different peptides within the mixture. Such ovine caseinate hydrolysates could be useful for food industry applications, aiming to potentially increase the nutritional value and shelf-life of food products, and also in the development of functional foods. The physicochemical characterization and properties of ovine caseinate hydrolysates are under investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Cooperation Program between Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) of the Ministry of Education from Brazil and Technology and Productive Innovation Ministry (MINCyT) from Argentine, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

REFERENCES

- FitzGerald RJ, Murray BA and Walsh DJ, Hypotensive peptides from milk proteins. *J Nutr* **134**:980S–988S (2004).
- Haque E and Chand R, Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. *Eur Food Res Technol* **227**:7–15 (2008).
- Sarmadi BH and Ismail A, Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides* **31**:1949–1956 (2010).
- Silva SV and Malcata FX, Casein as source of bioactive peptides. *Int Dairy J* **15**:1–15 (2005).
- Korhonen H, Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. *J Funct Foods* **1**:177–187 (2009).
- Korhonen H and Pihlanto A, Bioactive peptides: production and functionality. *Int Dairy J* **16**:945–960 (2006).
- Phelan M, Aheme A, FitzGerald RJ and O'Brien NM, Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *Int Dairy J* **19**:643–654 (2009).
- Minervini F, Algaron F, Rizzello CG, Fox PF, Monnet V and Gobetti M, Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Appl Environ Microbiol* **69**:5297–5305 (2003).
- Benkerroum N, Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. *Int J Dairy Technol* **63**:320–338 (2010).
- Corrêa APF, Daroit DJ and Brandelli A, Characterization of a keratinase produced by *Bacillus* sp. P7 isolated from an Amazonian environment. *Int Biodeterior Biodegrad* **64**:1–6 (2010).
- Moatsou G, Samolada M, Katsabeki A and Anifantakis E, Casein fraction of ovine milk from indigenous Greek breeds. *Lait* **84**:285–296 (2004).
- Adler-Nissen J, Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J Agric Food Chem* **27**:1256–1262 (1979).
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M and Rice-Evans C, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* **26**:1231–1237 (1999).
- Brand-Williams W, Cuvelier ME and Berset C, Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Technol* **28**:25–30 (1995).
- Chang CY, Wu KC and Chiang SH, Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chem* **100**:1537–1543 (2007).
- Zhu K, Zhou H and Qian H, Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochem* **41**:1296–1302 (2006).
- Cushman DW and Cheung HS, Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* **20**:1637–1648 (1971).
- Motta AS and Brandelli A, Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *J Appl Microbiol* **92**:63–70 (2002).
- Srinivas S and Prakash V, Bioactive peptides from bovine milk α -casein: isolation, characterization and multifunctional properties. *Int J Pept Res Ther* **16**:7–15 (2010).
- Hogan S, Zhang L, Li J, Wang H and Zhou K, Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef. *Food Chem* **117**:438–443 (2009).
- Zhang L, Li J and Zhou K, Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. *Bioresour Technol* **101**:2084–2089 (2010).
- Jiang J, Chen S, Ren F, Luo Z and Zeng SS, Yak milk casein as a functional ingredient: preparation and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. *J Dairy Res* **74**:18–25 (2007).
- Dryáková A, Pihlanto A, Marnila P, Eurda L and Korhonen HJT, Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *Eur Food Res Technol* **230**:865–874 (2010).
- Rival SG, Boeriu CG and Wichers HJ, Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J Agric Food Chem* **49**:295–302 (2001).
- Gómez-Ruiz JA, López-Expósito I, Pihlanto A, Ramos M and Recio I, Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Eur Food Res Technol* **227**:1061–1067 (2008).
- Pownall TL, Udenigwe CC and Aluko RE, Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *J Agric Food Chem* **58**:4712–4718 (2010).
- Silva SV, Pihlanto A and Malcata FX, Bioactive peptides in ovine and caprine cheese-like systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*. *J Dairy Sci* **89**:3336–3344 (2006).
- Mao XY, Cheng X, Wang X and Wu SJ, Free-radical-scavenging and anti-inflammatory effect of yak milk casein before and after enzymatic hydrolysis. *Food Chem* **126**:484–490 (2011).
- Saiga A, Tanabe S and Nishimiura T, Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J Agric Food Chem* **51**:3661–3667 (2003).
- Zhu YP, Fan JF, Cheng YQ and Li LT, Improvement of the antioxidant activity of Chinese traditional fermented okara (Meitauza) using *Bacillus subtilis* B2. *Food Control* **19**:654–661 (2008).
- Contreras MM, Carrón R, Montero MJ, Ramos M and Recio I, Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *Int Dairy J* **19**:566–573 (2009).
- Zhu Z, Qiu N and Yi J, Production and characterization of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernel protein hydrolysate. *Eur Food Res Technol* **231**:13–19 (2010).
- Bottone EJ, *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev* **23**:382–298 (2010).
- López-Expósito I, Gómez-Ruiz JA, Amigo L and Recio I, Identification of antibacterial peptides from ovine α ₂-casein. *Int Dairy J* **16**:1072–1080 (2006).
- Floris R, Recio I, Berkhout B and Visser S, Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof. *Curr Pharm Design* **9**:1257–1275 (2003).
- Rhodes JC, *Aspergillus fumigatus*: growth and virulence. *Med Mycol* **44**:S77–S81 (2006).

RESULTADOS II

1 Antioxidant properties and angiotensin-converting enzyme inhibitory
2 activity of sheep cheese whey hydrolysates

3

4 Ana Paula Folmer Corrêa,^a Daniel Joner Daroit,^b Roberta Fontoura,^a Stela Maris
5 Meister Meira,^a Cibele Freitas Oliveira,^a and Adriano Brandelli^{a*}

6

7 ^a Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Instituto de Ciência e
8 Tecnologia de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul
9 (UFRGS), 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

10 ^b Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Cerro Largo, 97900-000
11 Cerro Largo, RS, Brazil

12

13 * Correspondence: Adriano Brandelli, ICTA-UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500,
14 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil. Fax: +55 51 3308 7048; E-mail: abrand@ufrgs.br

15

16

17 **Abstract**

18 Enzymatic proteolysis may be employed to release bioactive peptides, which have been
19 investigated for potential benefits from both technological and human health
20 perspectives. In this study, sheep cheese whey (SCW) was hydrolyzed with a protease
21 preparation from *Bacillus* sp. P7, and the hydrolysates were evaluated for antioxidant
22 and angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activities. Soluble protein and
23 free amino acids increased during hydrolysis of SCW for up to 4 h. Antioxidant activity
24 of hydrolysates, evaluated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid
25 radical scavenging method, increased 3.2-fold from 0 h (15.9%) to 6 h of hydrolysis
26 (51.3%). Maximum Fe²⁺ chelation was reached in 3-h hydrolysates, and the reducing
27 power peaked at 1 h of hydrolysis, representing 6.2 and 2.1-fold increase, respectively,
28 when compared to that of non-hydrolyzed SCW. ACE inhibition by SCW was improved
29 through hydrolysis, reaching maximal values (55% inhibition) in 4-h hydrolysates;
30 however, a 42% inhibition was already observed after 1 h of hydrolysis. Controlled
31 enzymatic hydrolysis increased the antioxidant and ACE-inhibitory activities of SCW.
32 Such a biotechnological approach might be an interesting strategy for SCW processing,
33 potentially contributing to the management and valorization of this abundant dairy
34 byproduct.

35

36 **Keywords:** cheese whey; microbial protease; protein hydrolysates; bioactive peptides;
37 antioxidant activity; antihypertensive activity

38

39 **1. Introduction**

40 Whey is a major byproduct of cheese and casein industries, representing about 85-95%
41 of the milk volume, and consisting basically of water (94-95%, v v⁻¹), lactose (3.8-4.0%,
42 m v⁻¹), proteins (0.8-1.0%, m v⁻¹), and minerals (0.7-0.8% m v⁻¹). Because of its low
43 concentration of total solids (6-7% dry matter), whey has commonly been considered as
44 a waste product. However, since millions of tons of whey are produced worldwide and
45 it possess high chemical and biochemical oxygen demands, discard of this byproduct as
46 an effluent represents an important source of environmental problems (González-Siso,
47 1996).

48 Due to its polluting potential, the disposal of untreated whey has been severely
49 restricted, prompting the dairy industry to search for alternative management practices.
50 Among the different strategies, whey can be used in supplemental feeding of livestock;
51 irrigation of soil and pastures for agriculture; as a source of lactose and proteins for food
52 and industrial applications; in fuel production (such as ethanol, hydrogen, methane) and
53 obtainment of bioproducts through fermentation technologies; among others.
54 Considering its volume and composition, cheese whey could be viewed as an important
55 source of proteins with consistent functional and nutritious properties, for utilization in
56 the food industry (Park et al., 2007; Simithers, 2008; Prazeres et al., 2012).

57 Technologies that allow the transformation of cheese whey into other products
58 are increasingly focused, since such processes potentially act both as valorization
59 strategies and effluent management practices. One of the processes that could promote
60 value-aggregation to whey proteins is enzymatic hydrolysis. This treatment promotes
61 the fractionation of parent proteins into smaller units, usually improving functional
62 properties such as solubility, emulsifying power, and texture. Hence, enzymatic

63 hydrolysis may increase the applicability of whey proteins into food products (Binha et
64 al., 2007). Also, whey proteins contain amino acid sequences that are capable of
65 modulating physiological responses. Enzymatic hydrolysis can release such bioactive
66 peptides from precursor proteins and, particularly, antioxidant, antimicrobial,
67 immunomodulatory, antiulcerogenic, antihypertensive, opioid, and hypocholesteremic
68 activities are reported for whey protein-derived hydrolysates and peptides (Hernández-
69 Ledesma et al., 2011; Madureira et al., 2011; Tavares et al., 2011).

70 The bulk literature reports the biological activities of bovine whey hydrolysates
71 obtained with commercial proteases. However, whey proteins account for 17-22% of
72 sheep milk proteins, mainly represented by β -lactoglobulin and α -lactalbumin which, in
73 turn, make up to 70-80% of total whey proteins (Park et al., 2007). Also, the
74 investigation of alternative proteolytic enzymes from different sources is an interesting
75 approach to obtain protein hydrolysates and bioactive peptides with desired properties.
76 Specifically, *Bacillus* sp. P7, a bacterium isolated from the intestine of an Amazon basin
77 fish, produces high levels of extracellular proteases with biotechnological potential
78 (Corrêa et al., 2010). In this context, this study aimed to evaluate the antioxidant and
79 antihypertensive activities of sheep cheese whey hydrolysates obtained through
80 treatment with a protease preparation from *Bacillus* sp. P7.

81

82 **2. Materials and methods**

83 *2.1 Enzyme production and protease preparation*

84 *Bacillus* sp. P7 was maintained in Brain-Heart Agar (BHA) plates. For protease
85 production, the strain was cultivated in feather meal broth (10 g L⁻¹ feather meal, 0.3 g
86 L⁻¹ Na₂HPO₄, 0.4 g L⁻¹ NaH₂PO₄, 0.5 g L⁻¹ NaCl) for 48 h at 30°C in a rotary shaker

87 (125 rpm). After this period, the culture was centrifuged ($10\,000 \times g$ for 15 min at 4°C)
88 and the supernatant was submitted to a partial purification protocol involving
89 ammonium sulphate concentration (60% saturation) followed by liquid chromatography
90 on a Sephadex G-100 gel permeation column (25×0.5 cm), which was equilibrated and
91 eluted with 20 mmol L^{-1} Tris-HCl buffer (pH 8.0). Fractions with proteolytic activity on
92 azocasein (Corrêa et al., 2011) were pooled and used as the protease preparation for
93 sheep whey hydrolysis.

94

95 *2.2 Enzymatic hydrolysis of sheep cheese whey*

96 Sheep cheese whey (SCW), obtained from a local cheese manufacturer, was lyophilized
97 and subsequently dissolved in Tris-HCl buffer (20 mmol L^{-1} , pH 8.0). This solution (10
98 g L^{-1}) was preheated at 45°C for 15 min, and the hydrolysis was initiated by adding the
99 protease preparation (2%, v v^{-1}). Incubation was performed at 45°C in a water bath with
100 reciprocal shaking and, at specified intervals (0, 0.5, 1, 2, 3, 4 and 6 h) samples were
101 removed and the hydrolysis reaction was terminated by heating at 100°C for 15 min.
102 After cooling, the hydrolysates were centrifuged ($10,000 \times g$ for 15 min) to remove
103 insoluble materials, and the supernatants were lyophilized and stored at -18°C until
104 further analyses.

105

106 *2.3 Determination of soluble protein and free amino acids concentration*

107 The concentration of soluble protein on the supernatant of the hydrolysates was
108 determined by the Folin phenol reagent method (Lowry et al., 1951), using bovine
109 serum albumin as standard. Concentration of amino acids was determined by the

110 ninhydrin method (Moore and Stein, 1957), using glycine as standard. All
111 measurements were performed using a Shimadzu UV mini-1240 spectrophotometer.

112

113 *2.4 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging*
114 *assay*

115 Scavenging activity of SCW hydrolysates (SCWH) supernatants against the ABTS
116 radical was determined by the decolorization method described by Re et al. (1999). The
117 ABTS radical cation (ABTS^{•+}) solution was prepared by reacting 5 mL of ABTS
118 solution (7 mmol L⁻¹) with 88 µL of K₂SO₄ solution (140 mmol L⁻¹) and allowing the
119 mixture to stand in the dark at room temperature for 12-16 h before use. For the assay,
120 ABTS^{•+} solution was diluted with 5 mmol L⁻¹ phosphate buffered saline (pH 7.4) to an
121 absorbance of 0.7 (±0.02) at 734 nm. A 10 µL sample (50 mg mL⁻¹) was mixed with 1
122 mL of diluted ABTS^{•+} solution and absorbance (734 nm) was measured after 6 min. The
123 percentage decrease of absorbance at 734 nm was calculated in comparison to that of
124 controls.

125

126 *2.5 Iron(II) chelating activity assay*

127 The ferrous ion chelating ability of hydrolysate supernatants was determined according
128 to Tang et al. (2002), with the following modifications. A sample volume of 1 mL (50
129 mg mL⁻¹ concentration) was mixed with 3.7 mL of distilled water, 0.1 mL of 2 mmol L⁻¹
130 FeSO₄ (Fe²⁺) and 0.2 mL of 5 mmol L⁻¹ ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-
131 sulfonic acid)-1,2,4-triazine). After 10 min, the absorbance of the reaction mixture was
132 read at 562 nm. Likewise, 1 mL of distilled water, instead of sample, was used as a
133 control. EDTA (20 mg mL⁻¹) was used as standard. Chelating activity was calculated as

134 follows: Chelating activity (%) = $[1 - (\text{Absorbance of sample}/\text{Absorbance of control})] \times$
135 100.

136

137 2.6 Reducing power

138 The reducing power of SCWH supernatants was assessed according to the method of
139 Duh et al. (1999). Samples (50 mg mL^{-1}) in phosphate buffer (2.5 mL , 0.2 mol L^{-1} , pH
140 6.6) were added to 2.5 mL of 10 g L^{-1} potassium ferricyanide solution, and the mixture
141 was incubated at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ for 20 min. Trichloroacetic acid (2.5 mL of a 10% solution, w v⁻
142 ¹) was added to the mixture, which was then centrifuged at $3,000 \times g$ for 10 min. The
143 supernatant (2.5 mL) was mixed with 2.5 mL of distilled water and, after addition of 0.5
144 mL of ferric chloride solution (1%, w v⁻¹), the absorbance was measured at 700 nm .
145 Higher absorbance of the reaction mixture indicates a greater reducing power. BHT at
146 the same concentration of samples was used as a positive control.

147

148 2.7 Determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity

149 ACE-inhibitory activity of SCWH supernatants was evaluated *in vitro* by the method of
150 Cushman and Cheung (1971), with some modifications. $20 \text{ }\mu\text{L}$ samples (50 mg mL^{-1})
151 were added to $200 \text{ }\mu\text{L}$ of buffered substrate solution (5 mmol L^{-1} hippuryl-histidyl-
152 leucine in 50 mmol L^{-1} HEPES-HCl buffer containing 300 mmol L^{-1} NaCl, pH 8.3, 37
153 $^\circ\text{C}$). The reaction was started by adding $40 \text{ }\mu\text{L}$ of ACE (0.1 U mL^{-1}), carried out at 37
154 $^\circ\text{C}$ for 30 min, and stopped with $150 \text{ }\mu\text{L}$ of 1 mol L^{-1} HCl. Then, the hippuric acid
155 released was extracted with 1 mL of ethyl acetate, and the organic phase was transferred
156 to a glass tube to be heat-evaporated. The residue was dissolved with $800 \text{ }\mu\text{L}$ of distilled
157 water and measured spectrophotometrically at 228 nm . ACE-inhibitory activity was

158 expressed as percentage, using the following formula: % inhibitory activity = $(A - B) /$
159 $(A - C) \times 100$, where A is the absorbance without sample, B is the absorbance without
160 ACE, and C is absorbance in the presence of both ACE and the sample.

161

162 2.8 Statistical analysis

163 Experimental data were expressed as mean \pm standard deviation, and evaluated by the
164 Tukey test at a 95% significance level.

165

166 3. Results and discussion

167 Numerous researches focus on the generation and characterization of bioactive peptides
168 from food proteins, particularly caseins. The bioactivities of protein hydrolysates and
169 peptides are largely dependent on the enzymes used and also on the protein to be
170 hydrolyzed. Hence, the search for suitable protein sources and proteolytic enzymes has
171 attracted increasing attention due to the potential of the hydrolysates and peptides for
172 applications in food science, technology, nutrition and human health (Phelan et al.,
173 2009; Sarmadi and Ismail, 2010). In this perspective, the biological activities of SCW
174 hydrolysates (SCWH), obtained with a bacterial protease preparation, were investigated
175 as an alternative strategy for the destination of SCW, a co-product that is usually
176 discarded, particularly by small and medium dairy companies.

177 Initially, the soluble protein and free amino acid profiles were determined on
178 supernatants during the hydrolysis of SCW by the protease preparation from *Bacillus*
179 sp. P7. It could be observed from Fig. 1 that both measurements tended to increase as
180 the hydrolysis progressed; however, at 6 h of hydrolysis, both values decreased.
181 Maximum soluble protein and amino acid concentrations were 97 mg mL^{-1} and 0.28 mg

182 mL⁻¹ after 4 h of hydrolysis, respectively. Rates of soluble protein release appeared to
183 be higher during the first hour of hydrolysis, decreasing thereafter, which might indicate
184 a lesser availability of cleavable peptide bonds (Klompong et al., 2007; Corrêa et al.,
185 2011). Additionally, the solubilized peptides might be further hydrolyzed, decreasing
186 the release of peptides from SCW proteins due to substrate competition. Since the main
187 protease produced by *Bacillus* sp. P7 is a serine protease related to subtilisin (Corrêa et
188 al., 2010), a proteolytic enzyme with usual broad specificity, the enzyme could
189 potentially cleave a wide range of peptide bonds.

190 The amount of soluble protein tends to increase during hydrolysis, usually
191 reaching a plateau that is related to enzyme specificity and the protein substrate (Rossini
192 et al., 2009). Nevertheless, diminished amounts of soluble proteins and free amino acids
193 were observed at 6 h of hydrolysis on SCWH supernatants, when compared to that of
194 the other hydrolysates (Fig. 1). Enzymatic hydrolysis commonly exposes previously
195 hidden hydrophobic groups to the more polar (aqueous) environment. It is known that
196 hydrophobic attractive interactions are among the factors contributing to particle
197 aggregation (Daroit et al., 2012). Gelation was reported to occur, mainly through
198 hydrophobic interactions, in whey protein isolate (WPI) extensively hydrolyzed with
199 Alcalase, an enzyme preparation from *Bacillus licheniformis* (Doucet et al., 2003).
200 Aggregation was also observed for WPI hydrolyzed with a serine protease from *B.*
201 *licheniformis* (Creusot et al., 2006). In the current study, SCWH were centrifuged prior
202 to the evaluation of soluble proteins and free amino acids, and an increased trend on the
203 amount of sedimented material was observed following hydrolysates centrifugation
204 (data not shown), as previously reported for bovine whey (Otte et al., 1996). Therefore,

205 the above phenomenon could have been responsible for the observed declines on the
206 amount of soluble proteins and free amino acids at 6 h (Fig. 1).

207 Antioxidant activity of peptides is related with a greater number of ionizable
208 groups and also the exposition of hydrophobic groups (Sarmadi and Ismail, 2010).
209 Peptides in protein hydrolysates are reported to act as antioxidants through mechanisms
210 of radical-scavenging, inhibition of lipid peroxidation, chelation of metal ions, or a
211 combination of these mechanisms (Phelan et al., 2009). Thus, antioxidant activity
212 should be evaluated by different methods. In this study, the radical-scavenging ability of
213 SCWH supernatants was investigated with the ABTS^{•+} radical. The antioxidant activity
214 of the hydrolysates tended to increase with increasing hydrolysis times, indicating that
215 the peptides released could act directly as primary free radical scavengers in the
216 aqueous medium (Rossini et al., 2009). Maximum values were reached after 6 h of
217 hydrolysis, with a 3.2-fold increase when compared to the non-hydrolyzed whey (0-h
218 hydrolysate; Table 1). Similar increases were described for bovine whey protein isolate
219 hydrolyzed (at 37°C for 12 h) with pepsin, trypsin or chymotrypsin (Adjono et al.,
220 2013). Bovine whey protein concentrate enriched in β -lactoglobulin, hydrolyzed using
221 Corolase PP[®] and thermolysin (Contreras et al., 2011), and bovine whey protein
222 concentrate and α -lactalbumin, hydrolyzed with aqueous extracts of *Cynara*
223 *cardunculus* (Tavares et al., 2011), showed increased antioxidant activity when
224 compared to the non-hydrolyzed counterparts. Also, hydrolysis of bovine whey protein
225 concentrate by four commercial protease preparations (Alcalase, Flavourzyme, Neutrase
226 and Protamex) resulted in increased antioxidant activities, measured through the ABTS
227 method, in comparison to the untreated whey protein (Dryáková et al. 2010). Regarding
228 ovine caseins, hydrolysates obtained with pepsin, trypsin, chymotrypsin (Giménez-Ruiz

229 et al., 2008), with a protease preparation from *Bacillus* sp. P45 (Daroit et al., 2012), and
230 with the same bacterial protease employed in the current study (Corrêa et al., 2011),
231 also presented improved antioxidative performances.

232 The Fe²⁺-chelating ability of SCW hydrolysates are presented in Table 1. Non-
233 hydrolyzed SCW was able to chelate 13.87% of Fe²⁺, and hydrolysis was beneficial for
234 this property. Maximum chelating capability was observed at 2 h of hydrolysis (50.1%),
235 decreasing thereafter. The metal-chelating ability of WPI hydrolysates obtained with
236 Alcalase was also reported. Chelation of Cu²⁺ by the non-hydrolyzed WPI (8.7%)
237 increased during the first 3 h of hydrolysis (56.4%), followed by a slight decrease after
238 8 h (55.2%). In contrast, the Fe²⁺-chelating activity of Alcalase-hydrolyzed WPI at 0 h
239 was relatively low (3%) and only increased slightly after 8 h of hydrolysis (10.0%); a
240 behavior that might be related to more coordination sites present in Fe²⁺ (more chelators
241 needed) than Cu²⁺ (Peng et al., 2010). Metal-chelating activity of yellow stripe trevally
242 meat hydrolysates obtained with Alcalase or Flavourzyme increased with increasing
243 degree of hydrolysis, indicating that a higher degree of cleavage of peptide bonds
244 rendered protein hydrolysates with higher metal-chelating activities (Klompong et al.,
245 2007). On the other hand, protein hydrolysates from brownstripe red snapper muscle,
246 prepared using Alcalase or Flavourzyme, showed decreased ferrous ion chelating
247 activities as the degree of hydrolysis increased, suggesting that shorter peptide chains
248 might lose their ability to complex with Fe²⁺ (Khantaphant et al., 2011). Therefore, the
249 decline on chelating ability observed after 2 h of hydrolysis (Table 1) might indicate
250 that the peptides responsible for the observed activity were further cleaved, and the
251 products were less capable to chelate iron. In this sense, Zhang et al. (2010) observed
252 that, after fractionation of soy protein hydrolysates (obtained through treatment with

253 microbially-derived commercial proteases) by ultrafiltration, the high-molecular weight
254 fraction (>10 kDa) showed higher Fe²⁺-chelating activity than the low-molecular weight
255 fractions (<10 kDa).

256 The reducing power of the SCW hydrolysates was assessed by an electron
257 transfer protocol based on reduction of Fe³⁺/ferricyanide complex to the Fe²⁺ form.
258 After 1 h of hydrolysis, the reducing power of SCWH was 115% higher than that of
259 non-hydrolyzed SCW (Table 1). The reducing power of WPI hydrolysates obtained
260 with Alcalase, measured using the ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay, was
261 demonstrated to increase with hydrolysis time up to 5 h, reaching 3-to-6-fold higher
262 activities than non-hydrolyzed WPI (Peng et al., 2009; Peng et al., 2010). The 5-h WPI
263 hydrolysates were fractionated by gel filtration chromatography, and a 0.1-2.8 kDa
264 fraction exhibited the higher reducing power when compared to other fractions (>40
265 kDa, 2.8-40 kDa, and <0.1 kDa) (Kong et al., 2012). Although the reducing power of
266 SCWH declined at longer hydrolysis periods, the values were always higher than that of
267 the non-hydrolyzed counterpart (Table 1), as also observed for a soy protein fraction,
268 recovered from industrial effluents by ultrafiltration, hydrolyzed with Flavourzyme
269 (Moure et al., 2006), indicating that hydrolysis released peptides that were able to act as
270 electron donors (Sarmadi and Ismail, 2010). Hydrolysis of ovine caseinate with the
271 *Bacillus* sp. P7 enzyme preparation resulted in a reducing power that was 80% superior
272 when compared to the non-hydrolyzed caseinate (Corrêa et al., 2011). The reducing
273 power of mackerel meat hydrolysates increased gradually with the increasing hydrolysis
274 time (Wu et al., 2003). However, Klompong et al. (2007) observed a decreased reducing
275 power of yellow stripe trevally meat hydrolysates with increasing degree of hydrolysis
276 with Alcalase.

277 Although comparisons with other investigations might be difficult to be
278 performed, the antioxidant activities profile evaluated for the hydrolysates indicates that
279 hydrolysis is essential for the release of encrypted inactive antioxidant peptide
280 sequences from the primary structure of whey proteins (Phelan et al., 2009; Adjono et
281 al., 2013). The antioxidative properties of peptides and protein hydrolysates could have
282 a wide applicability, such as the protection of biological systems against oxidative
283 damages that are associated with diverse pathological conditions. In fact, bovine whey
284 protein hydrolysates and derived peptide fractions were shown to protect lung fibroblast
285 MRC-5 cells (Kong et al., 2012), and rat pheochromocytoma line 12 (PC12) cells
286 (Zhang et al., 2012), against the toxicity caused by H₂O₂. Iron, acting as a catalyst in the
287 production of hydroxyl radicals via Fenton reaction, potentially contributes to diseases
288 related to oxidative stress. Also, transition metal ions promote lipid oxidation, and their
289 chelation helps to retard the peroxidation and subsequently prevent food rancidity
290 (Rossini et al., 2009; Zhang et al., 2010; Khantaphant et al., 2011). In this sense, it was
291 demonstrated that the antioxidative potential of whey protein isolate hydrolysates
292 obtained with Protamex inhibited lipid oxidation during storage of cooked pork patties
293 (Peña-Ramos and Xiong, 2003). From a commercial perspective, protein hydrolysates
294 might be preferred over synthetic counterparts since, besides the antioxidative potential,
295 these hydrolysates might add to the nutritional value of foods and foodstuffs.

296 Angiotensin I-converting enzyme (ACE) occurs in many tissues and biological
297 fluids and plays an important physiological role in up-regulation of blood pressure;
298 hence, ACE has been implicated in hypertension, which constitutes a dominant health
299 problem worldwide, and one of the highest risk factors for eventual development of
300 cardiovascular diseases (FitzGerald et al., 2004). The ability of SCW hydrolysates to

301 inhibit the activity of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) is presented in Fig. 2.
302 It could be observed that the ACE-inhibitory activity of the hydrolysates increased with
303 hydrolysis time, maximum inhibition values were obtained for 4-h hydrolysates
304 (55.7%), and further hydrolysis have not significantly affected the ability to inhibit
305 ACE. Hydrolysis using proteolytic enzymes from different sources is also reported to
306 increase the ACE-inhibitory activity of bovine whey protein isolate/concentrate (Costa
307 et al., 2007; Otte et al., 2007; Tavares et al., 2011). Particularly, bovine milk whey
308 treated with pepsin plus trypsin showed a 50% of ACE inhibition (Pihlanto-Leppälä et
309 al., 1998). Similarly to the present study, Mullally et al. (1997) observed a low ACE-
310 inhibitory activity for non-hydrolyzed bovine whey protein concentrate (7.1%) which
311 was increased by hydrolysis with different proteases (35.5-88.6%). Therefore, whey
312 protein-derived ACE-inhibitory peptides/hydrolysates may find application in the
313 development of functional foods (Lopez-Fandiño et al., 2006). Ovine caseinate
314 hydrolyzed with protease from *Bacillus* sp. P7 for 2 h showed 94% of ACE inhibition
315 (Corrêa et al., 2011) and, in this sense, casein hydrolysates were demonstrated to
316 possess a higher ACE-inhibitory activity than whey protein substrates, which might be
317 due to the higher proline content of caseins – that contributes to the inhibitory activity
318 of peptides –, and /or the usually higher susceptibility of caseins to proteolysis – with
319 the possible generation of a wider variety of peptides (Pihlanto-Leppälä et al., 1998;
320 Otte et al., 2007).

321 Peptides generated from both α -lactalbumin and β -lactoglobulin are reported to
322 possess ACE-inhibitory properties (Otte et al., 2007; Contreras et al., 2011; Tavares et
323 al., 2011; Tavares et al., 2011b). As for antioxidant activities, the ability of generated
324 peptides in protein hydrolysates to inhibit ACE activity might be dependent on the

325 protease employed. The inhibition of ACE is usually greater when peptides contain
326 hydrophobic/aromatic amino acid residues at each of their three C-terminal positions
327 (FitzGerald et al., 2004). In this perspective, enzymes with specificity towards the
328 carboxylic side of aromatic and/or hydrophobic amino acid residues tend to generate
329 highly active ACE-inhibitory peptides (Lopez-Fandiño et al., 2006). For instance, whey
330 protein isolate hydrolysates obtained with chymotrypsin - which specifically cleaves
331 after aromatic amino acid residues - or Alcalase - which cleaves preferentially after
332 hydrophobic residues - usually show increased ACE-inhibitory activities when
333 compared to hydrolysates obtained with other enzymes (Costa et al., 2007; Adjono et
334 al., 2013). In the present study, the protease preparation employed for SCW hydrolysis
335 contained a major subtilisin-like serine protease (Corrêa et al., 2010), which cleaves,
336 preferably, hydrophobic and aromatic amino acids at the substrate position P1.
337 Therefore, the exposure of aromatic and/or hydrophobic amino acids at the C-terminal
338 end of peptides during hydrolysis of the protease preparation from *Bacillus* sp. P7,
339 could have contributed to the increased ACE-inhibitory ability of SCW hydrolysates
340 when compared to non-hydrolyzed SCW.

341

342 **4. Conclusions**

343 The food industry is continuously faced with technological challenges to produce high
344 quality and safe foods, and to meet the increased consumer demands for more natural
345 and functional foods and/or food ingredients. Additionally, environmental aspects might
346 also be of concern, as in the case of cheese whey, which possesses a high pollutant load
347 and, thus, requires appropriate management strategies. From the results presented in this
348 manuscript, SCW could be a suitable substrate for controlled enzymatic hydrolysis by a

349 protease preparation from *Bacillus* sp. P7 aiming the release of bioactive peptides. The
350 SCW hydrolysates, presenting antioxidative and antihypertensive properties, might be
351 potentially employed to retard lipid oxidation and deterioration of foods (particularly in
352 meat and meat products), and also as functional ingredients or dietary supplements.
353 Therefore, such enzyme-based technology could be an interesting approach contributing
354 to the management of and value-aggregation to SCW. Additional efforts are focused on
355 the identification of the peptides responsible for the observed bioactivities.

356

357 **Acknowledgments**

358 This investigation was supported by CAPES and CNPq (Brasilia, Brazil), and
359 FAPERGS (Porto Alegre, Brazil).

360

361 **References**

362 Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., Agboola, S., 2013. Screening of whey protein isolate
363 hydrolysates for their dual functionality: influence of heat pre-treatment and enzyme
364 specificity. *Food Chemistry* 136, 1435-1443.

365 Contreras, M.M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P.J., Recio, I.,
366 2011. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with
367 thermolysin: optimization by response surface methodology. *LWT Food Science and*
368 *Technology* 44, 9-15.

369 Corrêa, A.P.F., Daroit, D.J., Brandelli, A., 2010. Characterization of a keratinase
370 produced by *Bacillus* sp. P7 isolated from an Amazonian environment. *International*
371 *Biodeterioration and Biodegradation* 64, 1-6.

- 372 Corrêa, A.P.F., Daroit, D.J., Coelho, J.G., Meira, S.M.M., Lopes, F.C., Segalin, J.,
373 Risso, P.H., Brandelli, A., 2011. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial
374 properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of*
375 *the Science of Food and Agriculture* 91, 2247-2254.
- 376 Costa, E.L., Gontijo, J.A.R., Netto, F.M., 2007. Effect of heat and enzymatic treatment
377 on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *International Dairy*
378 *Journal* 17, 632-640.
- 379 Creusot, N., Gruppen, H., van Koningsveld, G.A., de Kruif, C.G., Voragen, A.G.J.,
380 2006. Peptide-peptide and protein-peptide interactions in mixtures of whey protein
381 isolate and whey protein isolate hydrolysates. *International Dairy Journal* 16, 840-
382 849.
- 383 Cushman, D.W., Cheung, H.S., 1971. Spectrophotometric assay and properties of the
384 angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology* 20, 1637-
385 1648.
- 386 Daroit, D.J., Corrêa, A.P.F., Canales, M.M., Coelho, J.G., Hidalgo, M.E., Tichota,
387 D.M., Risso, P.H., Brandelli, A., 2012. Physicochemical properties and biological
388 activities of ovine caseinate hydrolysates. *Dairy Science and Technology* 92, 335-
389 351.
- 390 Doucet, D., Gauthier, S.F., Otter, D.E., Foegeding, E.A., 2003. Enzyme-induced
391 gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: comparison with the
392 plastein reaction and characterization of interactions. *Journal of Agricultural and*
393 *Food Chemistry* 51, 6036-6042.

- 394 Dryáková, A., Pihlanto, A., Marnila, P., Eurda, L., Korhonen, H.J.T., 2010. Antioxidant
395 properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *European*
396 *Food Research and Technology* 230, 865-874.
- 397 Duh, P.D., Tu, Y.Y., Yen, G.C., 1999. Antioxidant activity of water extract of Harn
398 Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *LWT Food Science and Technology* 32,
399 269-277.
- 400 FitzGerald, R.J., Murray, B.A., Walsh, D.J., 2004. Hypotensive peptides from milk
401 proteins. *Journal of Nutrition* 134, 980S-988S.
- 402 Gómez-Ruiz, J.A., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M., Recio, I., 2008.
403 Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by
404 HPLC-MS/MS. *European Food Research and Technology* 227, 1061-1067.
- 405 González Siso, M.I., 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review.
406 *Bioresource Technology* 57, 1-11.
- 407 Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Gómez-Ruiz, J.A., 2011. Bioactive components of
408 ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Research* 101, 196-204.
- 409 Khantaphant, S., Benjakul, S., Kishimura, H., 2011. Antioxidative and ACE inhibitory
410 activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper
411 prepared using pyloric caeca and commercial proteases. *Process Biochemistry* 46,
412 318-327.
- 413 Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Shahidi, F., 2007. Antioxidative activity
414 and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides*
415 *leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food*
416 *Chemistry* 102, 1317-1327.

- 417 Kong, B., Peng, X., Xiong, Y.L., Zhao, X., 2012. Protection of lung fibroblast MRC-5
418 cells against hydrogen peroxide-induced oxidative damage by 0.1-2.8 kDa
419 antioxidative peptides isolated from whey protein hydrolysate. *Food Chemistry* 135,
420 540-547.
- 421 López-Fandiño, R., Otte, J., van Camp, J., 2006. Physiological, chemical and
422 technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and
423 ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal* 16, 1277-1293.
- 424 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement
425 with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 267-275.
- 426 Madureira, A.R., Tavares, T., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., Malcata, F.X., 2011.
427 Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal*
428 *of Dairy Science* 93, 437-455.
- 429 Moore, S., Stein, W.H., 1957. A modified ninhidrin reagent for the photometric
430 determination of amino acids and related compounds. *Journal of Biological*
431 *Chemistry* 211, 907-913.
- 432 Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2006. Antioxidant properties of ultrafiltration-
433 recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates.
434 *Process Biochemistry* 41, 447-456.
- 435 Mullally, M.M., Meisel, H., FitzGerald, R.J., 1997. Angiotensin-I-converting enzyme
436 inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins.
437 *International Dairy Journal* 7, 299-303.
- 438 Otte, J., Ju, Z.Y., Færgemand, M., Lomholt, S.B., Qvist, K.B., 1996. Protease-induced
439 aggregation and gelation of whey proteins. *Journal of Food Science* 61, 911-916.

- 440 Otte, J., Shalaby, S.M., Zakora, M., Pripp, A.H., El-Shabrawy, S.A., 2007. Angiotensin-
441 converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: effect of
442 substrate, enzyme and time of hydrolysis. *International Dairy Journal* 17, 488-503.
- 443 Park, Y.W., Juárez, M., Ramos, M., Haenlein, G.F.W., 2007. Physico-chemical
444 characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68, 88-113.
- 445 Peña-Ramos, E.A., Xiong, Y.L., 2003. Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid
446 oxidation in cooked pork patties. *Meat Science* 64, 259-263.
- 447 Peng, X., Kong, B., Xia, X., Liu, Q., 2010. Reducing and radical-scavenging activities
448 of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase. *International Dairy Journal* 20,
449 360-365.
- 450 Peng, X., Xiong, Y.L., Kong, B., 2009. Antioxidant activity of peptide fractions from
451 whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry*
452 113, 196-201.
- 453 Phelan, M., Aherne, A., FitzGerald, R.J., O'Brien, N.M., 2009. Casein-derived
454 bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory
455 status. *International Dairy Journal* 19, 643-654.
- 456 Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T., Korhonen, H., 1998. Angiotensin I converting enzyme
457 inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal* 8,
458 325-331.
- 459 Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J., 2012. Cheese whey management: a review.
460 *Journal of Environmental Management* 110, 48-68.
- 461 Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999.
462 Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.
463 *Free Radicals Biology and Medicine* 26, 1231-1237.

- 464 Rossini, K., Noreña, C.P.Z., Cladera-Olivera, F., Brandelli, A., 2009. Casein peptides
465 with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates and mechanically
466 deboned poultry meat. *LWT Food Science and Technology* 42, 862-867.
- 467 Sarmadi, B.H., Ismail, A., 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review.
468 *Peptides* 31, 1949-1956.
- 469 Sinha, R., Radha, C., Prakash, J., Kaul, P., 2007. Whey protein hydrolysate: functional
470 properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food*
471 *Chemistry* 101, 1484-1491.
- 472 Smithers, G.W., 2008. Whey and whey proteins - from 'gutter-to-gold'. *International*
473 *Dairy Journal* 18, 695-704.
- 474 Tang, S.Z., Kerry, J.P., Sheehan, D., Buckley, D.J., 2002. Antioxidative mechanisms of
475 tea catechins in chicken meat systems. *Food Chemistry* 76, 45-51.
- 476 Tavares, T., Contreras, M.M., Amorim, M., Pintado, M., Recio, I., Malcata, F.X.,
477 2011b. Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-
478 converting enzyme: In vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes. *Peptides*
479 32, 1013-1019.
- 480 Tavares, T.G., Contreras, M.M., Amorim, M., Martín-Álvarez, P.J., Pintado, M.E.,
481 Recio, I., Malcata, F.X., 2011. Optimisation, by response surface methodology, of
482 degree of hydrolysis and antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein
483 hydrolysates obtained with cardoon extract. *International Dairy Journal* 21, 926-933.
- 484 Tavares, T.G., Monteiro, K.M., Possenti, A., Pintado, M.E., Carvalho, J.E., Malcata,
485 F.X., 2011. Antiulcerogenic activity of peptide concentrates obtained from hydrolysis
486 of whey proteins by proteases from *Cynara cardunculus*. *International Dairy Journal*
487 21, 934-939.

- 488 Wu, H.C., Chen, H.M., Shiau, C.Y., 2003. Free amino acids and peptides as related to
489 antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*).
490 Food Research International 36, 949-957.
- 491 Zhang, L., Li, J., Zhou, K., 2010. Chelating and radical scavenging activities of soy
492 protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid
493 peroxidation. Bioresource Technology 101, 2084-2089.
- 494 Zhang, Q.X., Ling, Y.F., Sun, Z., Zhang, L., Yu, H.X., Kamau, S.M., Lu, R.R., 2012.
495 Protective effect of whey protein hydrolysates against hydrogen peroxide-induced
496 oxidative stress on PC12 cells. Biotechnology Letters 34, 2001-2006.
- 497

498 **Figure legends**

499

500 **Fig. 1.** Soluble protein (■) and free amino acid (□) concentrations during the hydrolysis of
501 sheep cheese whey by the protease preparation from *Bacillus* sp. P7. Values are the means
502 of three independent experiments (S.E.M. \leq 5%).

503

504 **Fig. 2.** Inhibition of angiotensin-I converting enzyme activity by sheep cheese whey
505 hydrolysates obtained at different hydrolysis times. Values are the mean \pm standard
506 deviation for three independent experiments. Different lowercase letters indicate significant
507 differences ($p < 0.05$) by the *t* test.

508

509 **Table 1.** Antioxidant activities of sheep cheese whey hydrolysates^a

Hydrolysis time (h)	ABTS radical scavenging activity (%)	Fe ²⁺ -chelating ability (%)	Reducing power (absorbance at 700 nm)
0	15.89 ± 0.78 ^A	13.87 ± 0.004 ^A	0.397 ± 0.034 ^A
0.5	18.36 ± 1.12 ^A	19.05 ± 0.017 ^A	0.628 ± 0.010 ^B
1	32.61 ± 0.97 ^B	36.87 ± 0.033 ^B	0.855 ± 0.005 ^C
2	37.49 ± 1.99 ^B	50.15 ± 0.004 ^B	0.802 ± 0.038 ^C
3	38.11 ± 1.43 ^B	43.12 ± 0.015 ^B	0.631 ± 0.078 ^B
4	42.07 ± 1.67 ^B	40.43 ± 0.007 ^B	0.657 ± 0.067 ^B
6	51.30 ± 0.51 ^B	38.28 ± 0.005 ^B	0.733 ± 0.005 ^D

510

^a Values are the means ± standard deviation for three independent experiments. Values

511

followed by different uppercase letters within the same column indicate significant

512

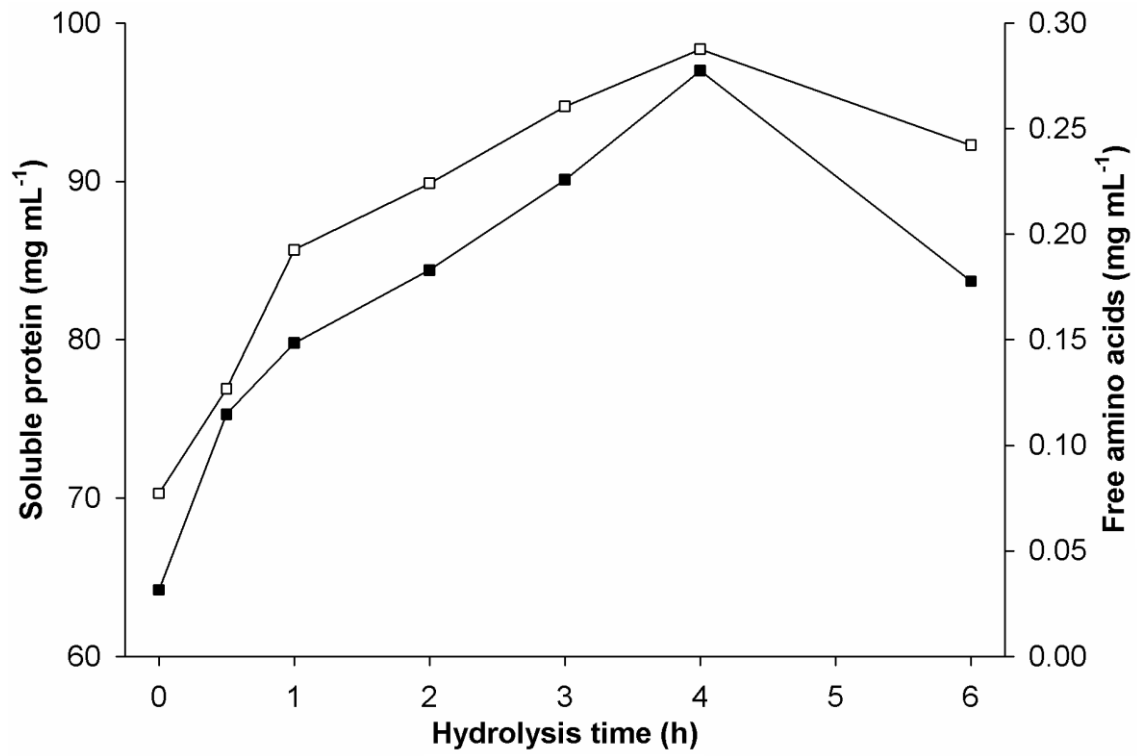
differences ($p < 0.05$) by *t* test.

513

514

515

516



517

518

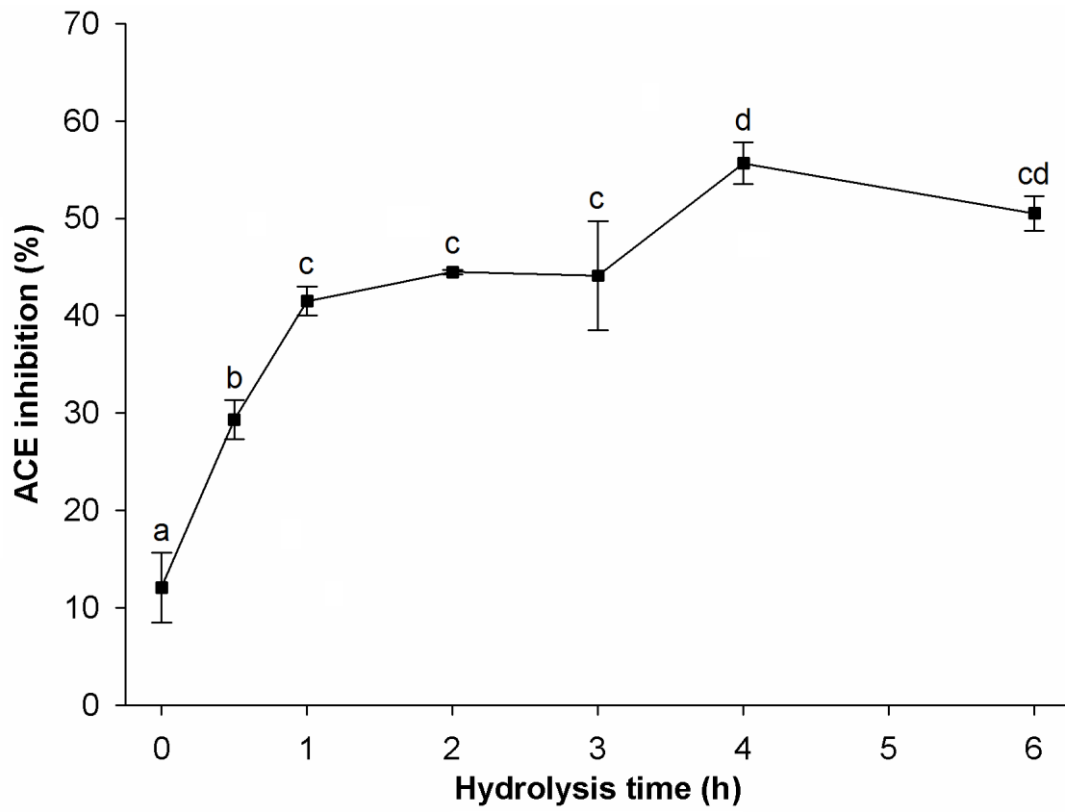
Corrêa et al., Fig. 1

519

520

521

522



523

524

525

Corrêa et al., Fig. 2

RESULTADOS III PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDOS BIOATIVOS

INTRODUÇÃO

O aumento na produção de alimentos industrializados tem criado uma demanda crescente de ingredientes que associem propriedades fisiológicas e funcionais. As frações proteicas do leite agregam atributos nutricionais, funcionais e fisiológicos, que podem ser isolados e utilizados pela indústria farmacêutica e de alimentos funcionais. Alimentos funcionais são entendidos como aqueles que apresentam componentes com potencial protetor da saúde, especialmente no que se refere às doenças crônicas não transmissíveis.

O leite é um ingrediente de importância fundamental para a indústria de alimentos. O fracionamento dessa matéria-prima gera uma série de produtos indicados para inúmeras aplicações, incluindo: soro ácido, caseinatos, coágulo de caseína, soro doce, concentrados e isolados proteicos de soro e lactoalbumina.

Nos últimos anos, vários peptídeos originados do leite tem sido identificados e caracterizados. Esses fragmentos proteicos apresentam propriedades bioquímicas específicas, que incluem atividade opióide, anti-hipertensiva, imunomoduladora, antitrombótica e antioxidante.

O leite de ovelha é produzido no Brasil principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Por ser muito mais concentrado do que o leite de vaca, geralmente é processado em derivados lácteos, especialmente queijos e iogurte, em todo o mundo. Entretanto, as pesquisas sobre o leite dessa espécie no Brasil são

poucas, havendo necessidade de desenvolver novos produtos e processos biotecnológicos com aplicação comercial/industrial a partir de diferentes matérias-primas, como o soro de queijo ovino e o caseinato ovino.

Os consumidores estão cada vez mais à procura de alimentos minimamente processados e/ou com propriedades funcionais, que possuam longa vida de prateleira, porém preparados sem a adição de conservantes químicos, o que leva as indústrias e instituições de pesquisa à busca de novas tecnologias de conservação e processamento. Uma das alternativas para aumentar a segurança e a vida de prateleira dos alimentos é a bioconservação, na qual uma microbiota protetora e/ou peptídeos bioativos são aplicados. Tais agentes também vêm sendo investigados quanto à produção de alimentos funcionais. Nessa terceira parte do estudo, hidrolisados de soro de queijo ovino e caseinato ovino, anteriormente produzidos utilizando enzimas proteolíticas de *Bacillus* sp. P7 e avaliados quanto às atividades antioxidantes e anti-hipertensivas, foram purificados e os possíveis peptídeos responsáveis por estas atividades identificados. A partir destes dados, poderá haver a possibilidade de aplicação destes peptídeos bioativos nas áreas de ciência e tecnologia de alimentos e nutrição, objetivando aumentar potencialmente o valor nutricional, a vida de prateleira e a segurança de produtos alimentícios, bem como o desenvolvimento de alimentos funcionais.

Com isso, o objetivo desse trabalho é purificar e identificar os peptídeos responsáveis pelas atividades biológicas já observadas em trabalhos anteriores.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas de produção e purificação parcial da enzima, hidrólise do soro de queijo ovino e do caseinato ovino, análise das atividades antioxidantes e anti-hipertensivas já foram anteriormente descritas. Esta etapa do trabalho visa purificar e identificar os possíveis peptídeos bioativos produzidos através da hidrólise controlada de soro de queijo ovino e caseinato ovino. Para atingir os objetivos propostos, os seguintes materiais e métodos foram empregados.

1.1 Fracionamento dos hidrolisados de caseinato ovino por ultrafiltração

Os hidrolisados de caseinato ovino no tempo de 3 horas de hidrólise que apresentaram melhor atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-hipertensiva foram fracionados por ultrafiltração utilizando membranas de massa molar de corte 10 kDa. Após a ultrafiltração, o potencial bioativo (antioxidante e anti-hipertensivo) da parte filtrada e da parte retida obtida foi analisado. Esta membrana de massa molar de corte 10 kDa foi utilizada com o objetivo de analisar sua eficiência na separação das proteínas durante a filtração do caseinato ovino.

1.2 Purificação dos peptídeos bioativos dos hidrolisados de soro de queijo ovino

O hidrolisado de soro de queijo ovino no tempo t4 horas que apresentou melhor atividade antioxidante e anti-hipertensiva foi aplicada em uma coluna de

cromatografia líquida de gel-filtração (Sephadex G-25) em volume não superior a 5% do volume de resina na coluna. A coluna (20 x 0,8 cm), com fluxo de 0,40 mL/minuto, foi eluída com tampão tris HCl (20 mM; pH 8,0), sendo coletadas 30 frações de 1 mL cada. As frações coletadas foram analisadas quanto às bioatividades, no intuito de obter uma única fração com melhor atividade antioxidante e anti-hipertensiva. A fração com a melhor atividade foi liofilizada e ressuspensa em tampão Tris-HCl (20 mM; pH 8,0) e então aplicada em outra coluna de gel-filtração (Sephadex G-10), nas mesmas condições anteriores. A fração que demonstrou melhor atividade antioxidante e anti-hipertensiva foi liofilizada e enviada para análise de espectrometria de massas.

1.3 Determinação da concentração de proteínas solúveis

Para determinar o conteúdo de proteína solúvel das amostras utilizou-se o método descrito por LOWRY *et al.* (1951), com o emprego de reagente de Folin-Ciocalteu. Trabalhou-se com dois reagentes: o reagente combinado (RC), preparado com 0,5 mL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5%, 0,5 mL de tartarato de Na/K 1% e solução de Na_2CO_3 (2%) em NaOH 0,1N até o volume de 50 mL; e o reagente de Folin-Ciocalteu (FC), que foi diluído (1:1) com água destilada.

Para a reação misturou-se 100 μL de amostra e adicionou-se 2,5 mL de RC, deixou-se 10 minutos a temperatura de 37 °C. Adicionou-se 300 μL do reagente de FC diluído e deixou-se à temperatura ambiente por mais 30 minutos. As determinações de proteína solúvel das amostras foram realizadas em triplicata e foi medida a absorbância (750nm) em espectrofotômetro Shimadzu modelo UVmini-1240. Paralelamente, foi preparado um controle com

100 μ L de água destilada mais reagentes. A concentração de proteína foi determinada através de comparação com curva-padrão preparada com albumina sérica bovina.

1.4 Espectrometria de massas

A fração do caseinato ovino e de soro de queijo ovino com melhor atividade antioxidante e anti-hipertensiva após etapa de purificação foi analisada por espectrometria de massas no centro de biotecnologia da UFRGS (Q-TOF micro - Micromass/Waters) a fim de se avaliar seu grau de pureza, determinar as massas moleculares dos componentes presentes, e identificar os possíveis peptídeos bioativos.

As amostras foram dissolvidas em uma solução acetonitrila/água 1:1 contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico. Um sistema de cromatografia líquida de ultra-alta pressão (UPLC, NanoAcquity, Waters) acoplado ao espectrômetro de massas com fonte de ionização por nano-eletrospray (nano-ESI) foi usado (Q-TOF micro - Micromass/Waters). O UPLC apresenta coluna Symmetry® C18 e uma coluna cromatográfica C18 Acquity UPLC BEH130. As separações cromatográficas foram realizadas com um gradiente de eluição com dois solventes: o solvente A foi 0,1% de ácido fórmico em água e o solvente B foi 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila. Para calibração, ácido fosfórico 0,1% (água/acetonitrila 1:1) foi usado. O espectrômetro de massas foi operado no modo de análise de íons positivo. As condições do eletrospray foram: fluxo de 0,6 μ L/min; voltagem do cone 40 V; capilar 3.3 kV; temperatura da fonte de 100 °C; gás no cone a 5 L/h; dessolvatação do gás a 30 L/h. As análises de MS/MS

foram realizadas usando gás argônio para a fragmentação dos peptídeos eluídos. Os dados foram analisados com o software Waters MassLynx. O espectro de MS/MS foi processado por subtração do sinal seguido da suavização do espectro com o método de Savitzky-Golay e medida do topo do pico com parte central de 80%. Os dados gerados foram processados com MASCOT Distiller (Matrix Science, UK), e os peptídeos homólogos foram pesquisados na base de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) usando o software MASCOT v. 2.2 (Matrix Science, UK).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Fracionamento dos hidrolisados de caseinato ovino por ultrafiltração

Os hidrolisados liofilizados de caseinato ovino no tempo de 3 horas foram utilizados nesta etapa do trabalho, pois apresentaram melhor atividade antimicrobiana.

Nesta etapa do trabalho foi utilizada membrana de corte molar de 10KDa nos hidrolisados de caseinato ovino (t3). Os resultados de atividades biológicas observadas para as frações retidas e filtradas na membrana de 10 kDa são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Atividades biológicas dos hidrolisados de caseinato ovino

Caseinato hidrolisado	ABTS %	Anti-hipert. %	Lowry (mg/mL)
Filtro 10KDa Retido	84,3±0,04 ^a	97,3±0,27 ^a	27,45±1,23 ^a
Filtro 10KDa Filtrado	62,3±0,12 ^b	91,1±0,13 ^a	17,63±0,97 ^a
Controle	68,5±0,08 ^b	62,7±0,58 ^b	31,7±1,22 ^a

As atividades biológicas e fisiológicas das proteínas do leite podem ser atribuídas a vários peptídeos, principalmente aqueles de baixa massa molecular que podem ser produzidos in vitro por hidrólise enzimática.

As atividades biológicas dos hidrolisados de caseinato ovino após a filtração por membrana de massa molar 10 KDa estão apresentados na tabela1. A atividade antioxidante quando avaliada pelo método ABTS e a atividade anti-hipertensiva, foi maior no hidrolisado retido. Segundo RAGHAVAN e KRISTINSSON (2009), esse resultado pode ser devido as condições empregadas, fazendo com que o processo de ultrafiltração pudesse reter peptídeos, cuja estrutura favorece as atividades biológicas desses hidrolisados.

Nesta etapa do trabalho as linhagens bacterianas utilizadas como indicadoras foram *Bacillus cereus* ATCC 9634 e *Corynebacterium fimi* NCTC 7547.

A capacidade dos hidrolisados de caseinato ovinos, após utilizar membrana de corte de 10 Kda, em inibir a multiplicação de bactérias foi investigada. Os resultados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Atividades antimicrobianas de hidrolisados de caseinato ovino utilizando membrana de corte de 10 kDa.

Microrganismo indicador	Zona inibição (mm)^a filtrado	Zona inibição (mm)^a retido
<i>Bacillus cereus</i> ATCC9634	8.7	11.2
<i>Corynebacterium fimi</i> ATCC7547	10.5	12.7

Peptídeos antimicrobianos derivados das proteínas do leite geralmente apresentam uma ampla atividade contra microrganismos deteriorantes e/ou de importância para a saúde. Esses resultados confirmaram a atividade dos hidrolisados investigados anteriormente.

A amostra filtrada do caseinato ovino foi enviada para análise de espectrometria de massas. Os resultados analisados pelo software MASCOT resultaram na identificação de um peptídeo majoritário, com massa molecular de 1426 Da, correspondente a fragmento da caseína α_{s1} (Tabela 3).

Tabela 3 - Identificação dos peptídeos do caseinato ovino

Íon para MS/MS (m/z) ^a	Massa observada	Massa calculada ^b	Fragmento sugerido	Sequência
714.3916 (2)	1426.7687	1426.8184	Caseína α_{s1} f(118-129)	KYNVPQLEIVPK

^aA carga é fornecida entre parênteses.

^bValor de massa monoisotópica.

A figura 1 apresenta o espectro de massas do íon m/z 714,3916 o qual foi identificado como um peptídeo derivado da caseína α_{s1} com a sequência KYNVPQLEIVPK.

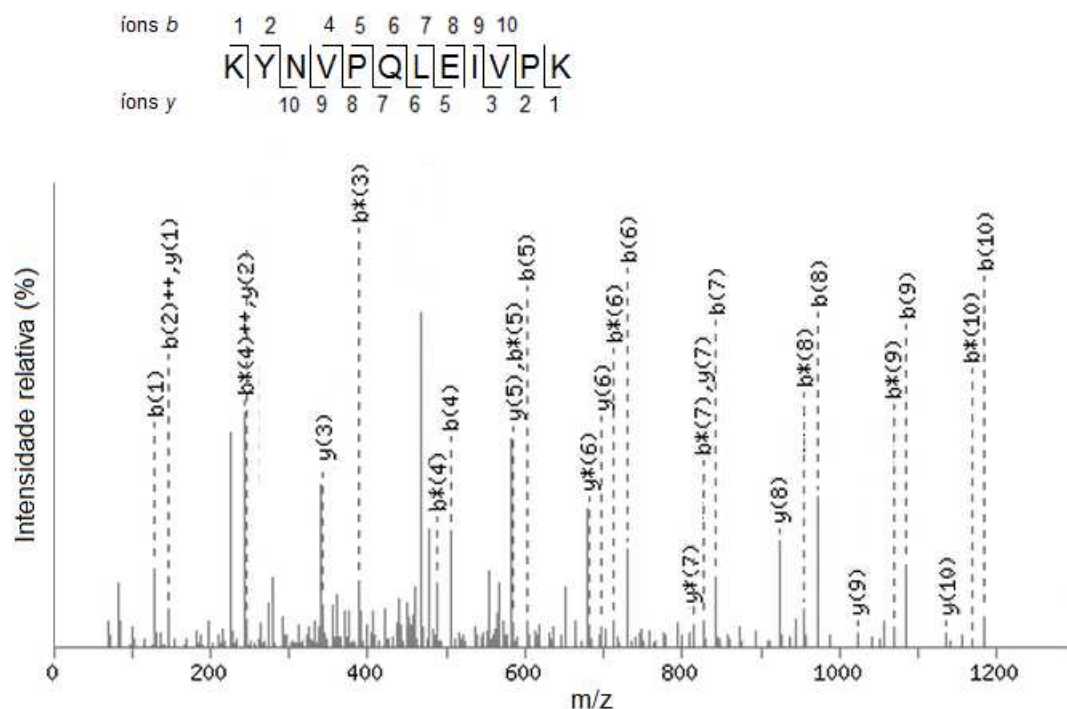


Figura 1 – Espectro de massas em tandem (MS/MS) do íon m/z 714,3916. Após interpretação da sequência e busca em banco de dados, o espectro MS/MS foi condizente com o fragmento 118-129 da caseína α_{s1} .

Em trabalhos já descritos anteriormente alguns peptídeos antibacterianos foram identificados a partir da α_{s1} -caseína e α_{s2} -caseína (RIZELLO *et al.*, 2005; MCCANN *et al.*, 2006).

O espectro de massas da Figura 1 foi consistente com a sequência KYNVPQLEIVPK que corresponde ao fragmento 118-129 da caseína α_{s1} . Alguns valores similares a essa sequência foram observados na comparação deste estudo com aqueles relatados para peptídeos obtidos a partir da hidrólise de caseinato bovino demonstrando atividade antimicrobiana (MCCANN *et al.*, 2006) e antioxidante (RIVAL *et al.*, 2001; SUETSUNA, UKEDA, and OCHI, 2000).

A sequência identificada no caseinato ovino, KYNVPQLEIVPK, apresenta homologia com peptídeos bioativos descritos na literatura. Os

peptídeos KKYNVPQL e LEIVPK foram isolados do queijo Manchego elaborado a partir de leite de ovelha e, após síntese, foram comprovadamente inibidores da enzima conversora da angiotensina (GOMES-RUIZ *et al.*, 2004). Ambos os peptídeos estão inseridos na sequência encontrada na amostra de caseinato, sugerindo que esta pode contribuir ou ser responsável pela atividade anti-hipertensiva observada.

2.2 Purificação de peptídeos bioativos dos hidrolisados de soro de queijo ovino

A cromatografia líquida de gel-filtração separa moléculas basicamente por tamanho e massa molecular, sendo que moléculas maiores são eluídas da coluna antes das moléculas menores. Isto ocorre, pois moléculas menores têm acesso a uma maior porção dos poros da resina na coluna e, com isso, a migração através da mesma ocorre em menor velocidade (SCOPES, 1994; POPOVICI & SCHOENMARKERS, 2005; YU *et al.*, 2006).

Os hidrolisados liofilizados de soro de leite ovino no tempo de 4 horas foram utilizados nesta etapa do trabalho, pois apresentaram melhor atividade antioxidante e anti-hipertensiva. Os hidrolisados utilizados nesta etapa foram filtrados por membranas de tamanho de poro de 0,22 μm antes de serem aplicados na coluna. Estes hidrolisados foram passados por colunas de gel filtração G-25 e G-10 (30 cm x 1 cm), onde foi aplicado 1 mL e coletadas no total 30 frações de 1 mL. Após foram feitas as análises de ABTS e atividade anti-hipertensiva.

Tabela 4. Atividades biológicas dos hidrolisados de soro de queijo ovino

Soro	ABTS %	Anti-hipert. %	Proteína (mg/mL)
T 4h	23,2±1,77 ^a	46,7±0,67 ^a	64,2±1,11 ^a
G-25	61,6±1,29 ^b	45,2±0,29 ^a	11,9±0,91 ^b
G-10	51,2±0,86 ^b	14,1±0,89 ^b	23,5±1,76 ^b

As atividades antioxidantes e anti-hipertensiva dos hidrolisados de soro de queijo ovino, após cromatografia líquida de gel filtração, foram avaliadas (Tabela 4). A atividade antioxidante quando analisada após a cromatografia de gel filtração Sephadex G-25 apresentou atividade de 61,6% e após cromatografia de gel filtração G-10 sua atividade foi de 51,2%. A atividade anti-hipertensiva também diminuiu após as etapas de gel filtração (para G-25: 45% e para G-10 de 14%).

A fração com maior atividade obtida através da cromatografia líquida de gel filtração utilizando a coluna G-25 do soro de queijo ovino foi enviada para análise de espectrometria de massas.

A tabela 5 apresenta o peptídeo majoritário após análise através de espectrometria de massas. Esse foi identificado como um fragmento sugerido derivado da β -lactoglobulina.

Tabela 5 - Identificação dos peptídeos do hidrolisado de proteínas do soro

Íon para MS/MS (m/z) ^a	Massa observada	Massa calculada ^b	Fragmento sugerido	Sequência
778.8811(2)	1555.7476	1555.7453	β -lactoglobulina f(167-180)	LAFNPTQLEGQCHV

^aA carga é fornecida entre parênteses.

^bValor de massa monoisotópica.

A Figura 2 apresenta o espectro de massas do íon m/z 778,8811 o qual foi identificado como um peptídeo derivado da β -lactoglobulina com a sequência LAFNPTQLEGQCHV.

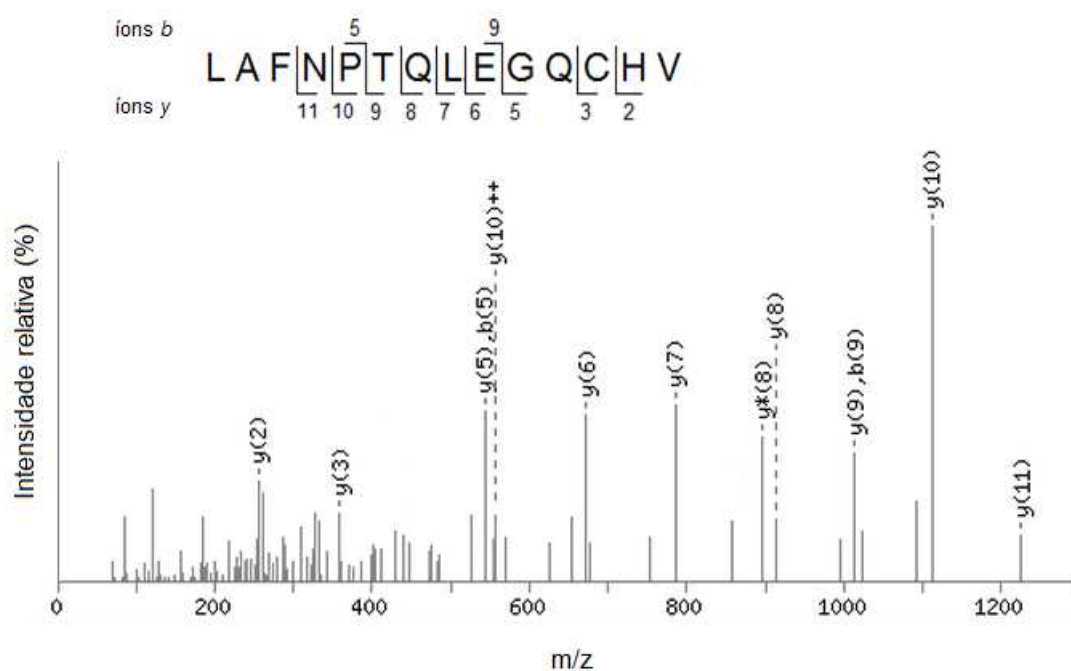


Figura 2 – Espectro de massas em tandem (MS/MS) do íon m/z 778,8811. Após interpretação da sequência e busca em banco de dados, o espectro MS/MS foi condizente com o fragmento 167-180 da β -lactoglobulina.

Vários peptídeos derivados da digestão proteolítica da β -lactoglobulina tem demonstrado atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina (ECA). Tem sido demonstrado que a β -lactoglobulina não hidrolisada apresenta atividade anti-hipertensiva muito baixa (MULLALLY, MEISEL, & FITZGERALD, 1997a, b), mas quando a proteína é hidrolisada utilizando pepsina, tripsina, quimotripsina e/ou outras proteases, resultou em índices elevados de inibição da ECA (73-90%). Estes trabalhos mostraram que os peptídeos bioativos eram geralmente curtos (< 8 aminoácidos).

Os peptídeos derivados do fragmento da β -lactoglobulina não apresentam bioativos descritos até agora na literatura. Estudos estão em andamento para continuar a purificação e identificação dos possíveis peptídeos responsáveis pelas bioatividades observadas, a fim de elucidar relações estrutura-atividade dos peptídeos presentes nos hidrolisados de soro de queijo ovino. Essa identificação exata das sequências de aminoácidos que conferem as bioatividades pode permitir a purificação e a síntese de peptídeos bioativos para sua posterior aplicação em alimentos. Além de possibilitar estudos para a otimização das condições de hidrólise, objetivando o enriquecimento dos hidrolisados com os peptídeos comprovadamente bioativos.

4. DISCUSSÃO GERAL

Peptídeos bioativos têm atraído atenção crescente devido às suas potenciais aplicações nas áreas de ciência e tecnologia de alimentos, nutrição e saúde humana. Peptídeos e hidrolisados protéicos, obtidos a partir da proteólise das diversas proteínas alimentares, são relatados como possuidores de atividade antioxidante. As atividades antioxidantes podem proteger os sistemas biológicos contra danos provocados pelo estresse oxidativo, que estão relacionados a diversas doenças humanas (SARMADI e ISMAIL, 2010). Estes peptídeos antioxidantes de hidrolisados também podem ser empregados na prevenção de reações de oxidação (tais como a peroxidação lipídica) que levam à deterioração de alimentos e gêneros alimentícios (ZHANG *et al.*, 2010). Na indústria de alimentos, peptídeos com atividade antioxidante apresentam particular importância, devido ao potencial carcinogênico de antioxidantes sintéticos como butil-hidroxianisol (BHA) e butil-hidroxi-tolueno (BHT) (ITO *et al.*, 1985), e ao reconhecimento da relação entre dieta e saúde, que aumenta a demanda dos consumidores por alimentos naturais e funcionais (FITZGERALD *et al.*, 2004).

Neste estudo, as atividades sequestrantes dos hidrolisados de caseinato ovino foram determinadas utilizando dois radicais, ABTS e DPPH.

Quando utilizado o radical DPPH os resultados variaram muito ao longo do tempo de hidrólise, e uma relação entre o tempo de hidrólise e a captura do radical DPPH não foi possível de ser estabelecida; no entanto, a maior atividade foi evidenciada após 1 h de hidrólise. A atividade antioxidante dos

hidrolisados de caseinato ovino quando avaliado pelo método ABTS tenderam a aumentar com o aumento nos tempos de hidrólise.

O comportamento distinto dos hidrolisados protéicos nos ensaios ABTS e DPPH pode ser explicado pela diferente estereosseletividade dos radicais, diferentes peptídeos presentes na amostra capazes de reagir e eliminar os diferentes radicais, e diferentes reações estequiométricas entre os componentes antioxidantes nos hidrolisados e os radicais ABTS e DPPH (ZHU *et al.*, 2008). Nesta perspectiva, o ensaio ABTS é um dos protocolos mais eficazes e mais comumente usados para monitorar atividades antioxidante (SILVA *et al.*, 2006).

O caseinato ovino quando submetido à hidrólise com a protease P7 por 30 minutos exibiu 83,3% de quelação de Fe^{2+} quando comparado com o controle (0 h; 76%). Maiores períodos de hidrólise provocaram a diminuição da atividade quelante de Fe^{2+} .

O poder redutor dos hidrolisados de caseinato ovino apresentou um pico de atividade após uma hora de hidrólise, decrescendo em seguida. Este ensaio é baseado na capacidade de um composto para reduzir o Fe^{3+} para a forma Fe^{2+} (POWNALL *et al.*, 2010).

Enzimas proteolíticas têm sido usadas com sucesso para gerar peptídeos inibidores da ECA a partir de proteínas alimentares, incluindo caseínas (JIANG *et al.*, 2007; CONTRERAS, CARRÓN, MONTERO, RAMOS, & RECIO, 2009; SRINIVAS & PRAKASH, 2010; ZHU *et al.*, 2010). A inibição da atividade da ECA pelos hidrolisados de caseinato ovinos aumentou até 2 h de hidrólise com a protease P7, diminuindo depois deste tempo. Resultados

semelhantes foram relatados em outros hidrolisados protéicos, indicando que existe um tempo ótimo de hidrólise ou grau ótimo de hidrólise e, como o tempo de hidrólise progrediu, os peptídeos inibidores da ECA foram hidrolisados para produzir peptídeos ou aminoácidos inativos (ZHU *et al.*, 2010).

Caseinato ovino hidrolisado por 3 h com a protease parcialmente purificada de *Bacillus* sp. P7 demonstrou atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Corynebacterium* sp., *Penicillium expansum* e *Aspergillus fumigatus*. As bactérias inibidas, particularmente *Bacillus cereus*, são importantes causas de intoxicação alimentar e deterioração, podendo também atuar como patógenos oportunistas em humanos (BOTTONNE, 2010). Os fungos inibidos pelo hidrolisado de caseinato ovino, *Penicillium expansum* e *Aspergillus fumigatus*, podem causar doenças em humanos e plantas (RHODES, 2006). Portanto a inibição de fungos filamentosos pode representar uma aplicação adicional dos hidrolisados como agentes antifúngicos.

A atividade antioxidante dos hidrolisados de soro de queijo ovino, quando avaliada pelo método ABTS, tendeu a aumentar com o incremento nos tempos de hidrólise (t_0 : 15,9%, t_6 : 51,3%). Resultados similares foram reportados em hidrolisados de proteína de soro obtidos com diferentes proteases microbianas (DRYÁKOVÁ *et al.*, 2010). Hidrolisados obtidos após a ação da protease P7 por duas horas, exibiram 50,1% de quelação de Fe^{2+} , enquanto que os controles (t_0) apresentaram apenas 13,87% de quelação; contudo, hidrólises por períodos maiores provocaram a diminuição da atividade quelante. O ferro atua como catalisador na produção de radicais hidroxila através da reação de Fenton (POWNALL *et al.*, 2010), portanto contribuindo

potencialmente para doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Além disso, metais de transição podem estimular a peroxidação lipídica em alimentos, resultando em rancidez (ZHANG *et al.*, 2010). O poder redutor apresentou-se mais elevado após uma hora de hidrólise (hidrolisados t_1). Esta capacidade indica que os hidrolisados podem atuar como doadores de elétrons, reduzindo os intermediários oxidados em processos de peroxidação lipídica. Consequentemente, a quelação de íons metálicos pode contribuir para a atividade antioxidante dos hidrolisados protéicos. De fato, a atividade antioxidante de peptídeos e hidrolisados protéicos usualmente resulta de diferentes mecanismos, que incluem o sequestro de radicais, inibição da peroxidação lipídica, quelação de íons metálicos, ou uma combinação destes (RIVAL *et al.*, 2001). Logo, o potencial antioxidante deve ser avaliado por diferentes métodos. A atividade antioxidante apresentada pelos hidrolisados pode atuar na proteção contra danos celulares e doenças crônicas relacionadas ao estresse oxidativo. Estes hidrolisados podem ser também empregados pela indústria de alimentos na prevenção de reações de oxidação (como peroxidação lipídica) que levam à diminuição da vida de prateleira, deterioração da qualidade nutricional e sensorial de alimentos.

A capacidade de inibição da atividade da enzima conversora de angiotensina-I (ECA) aumentou até 4 horas de hidrólise (t_0 : 12,1%, t_4 : 55,7%), diminuindo após este período. A ECA faz parte do sistema renina-angiotensina, que desempenha um papel importante na regulação da pressão arterial. Neste sistema, a ECA catalisa a conversão da angiotensina I em angiotensina II, que é um potente vasoconstritor; além disso, a ECA degrada a bradicinina, um

peptídeo vasodilatador. Assim, os inibidores da ECA podem reduzir potencialmente a hipertensão, sendo potencialmente úteis na prevenção e/ou tratamento de doenças cardiovasculares (FITZGERALD *et al.*, 2004).

Neste estudo a sequência identificada no caseinato ovino, KYNVPQLEIVPK, apresentou homologia com peptídeos anti-hipertensivos, antimicrobianos e antioxidantes já descritos na literatura (MCCANN *et al.*, 2006; RIVAL *et al.*, 2001; SUETSUNA, UKEDA, and OCHI, 2000; GOMES-RUIZ *et al.*, 2004). Já a sequência do soro de queijo ovino, LAFNPTQLEGQCHV, não apresentaram bioativos descritos até agora na literatura.

5. CONCLUSÕES

A indústria de alimentos é continuamente confrontada com desafios tecnológicos para a produção de alta qualidade e alimentos seguros, e para atender às demandas dos consumidores aumentou o consumo de alimentos naturais e funcionais e / ou ingredientes alimentares.

Hidrolisados de caseinato ovino apresentando atividades antioxidante, anti-hipertensiva e antimicrobiana foram produzidos a partir de uma protease microbiana parcialmente purificada de *Bacillus* sp. P7. As bioatividades apresentadas pelos hidrolisados protéicos podem ser resultado do efeito sinérgico de diferentes peptídeos dentro da mistura. Esses hidrolisados de caseinato ovino podem ser úteis em aplicações na indústria alimentícia, com o objetivo de aumentar potencialmente o valor nutricional e a vida de prateleira de produtos alimentícios, bem como no desenvolvimento de alimentos funcionais.

Neste estudo, demonstrou-se que a hidrólise enzimática controlada pode atuar no incremento das capacidades antioxidantes e da atividade anti-hipertensiva de soro de queijo ovino. Observou-se que o tempo de hidrólise pode afetar as bioatividades avaliadas. Este estudo indica que a hidrólise enzimática pode ser potencialmente empregada como uma tecnologia de processamento do soro de queijo ovino. Esta tecnologia apresenta duas vantagens intrínsecas para a indústria, quais sejam: a bioconversão de um subproduto potencialmente poluente produzido abundantemente em laticínios, e a concomitante agregação de valor a este subproduto. Os hidrolisados

obtidos oferecem a possibilidade de aplicação em áreas como a ciência e tecnologia de alimentos e nutrição, com o objetivo de aumentar potencialmente o valor nutricional e a vida de prateleira de produtos alimentícios, bem como para o desenvolvimento de alimentos funcionais.

A partir desses estudos deve-se concentrar na purificação e identificação dos peptídeos presentes nos hidrolisados de caseinato ovino e soro de queijo ovino.

REFERÊNCIAS

ABERT, T.; KNEIFEL, W. Physicochemical and functional properties of casein hydrolysates obtained by treatment with different enzymes. In: IDF, editor. Protein and fat globule modifications by heat treatment, homogenization and other technological means for high quality dairy products. Proceedings of the International Dairy Federation Seminar; 1992 Aug 25-28; Munich, Germany. Brussels: FIL-IDF; p. 97-105, 1993.

ADLER-NISSEN, J. Procesamiento enzimático de las proteínas alimenticias. *Alimentos*, v. 6, p. 29 - 33, 1981.

ADLER-NISSEN, J. Enzymic hydrolysis of food proteins, Elsevier Applied Science, London, pp. 12-19, 1985.

ALVAREZ, E.M.; RISSO, P.H.; GATTI, C.A.; BURGOS, M.; SUAREZ SALA, V. Calcium-induced aggregation of bovine caseins: effect of phosphate and citrate. *Colloid and Polymer Science*, v. 285, n. 5, p. 507-514, 2007.

ALVAREZ, E.M.; RISSO, P.H.; MANCILLA CANALES, M.A.; PIRES, M.S.; GATTI, C.A. Hydrodynamic properties–structure relationship for sodium caseinates in presence of calcium. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 327, p. 51-56, 2008.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127:183-198, 2002.

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. *Bioresource Technology*, v. 64, p. 175-183, 1998.

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*, 63, 320-338, 2010.

BERGER, Y. Sheep's milk and its uses. 2005. Disponível em: <<http://www.sheepmilk.biz/sheepmilk.html>>. Acesso em: 20 dez. 2012.

BERNARDI, D.L.S.; PILOSOFF, A.M.R. e BARTHOLOMAI, G.B. Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases. *Journal of American Oil Chemical Society*. V. 68, n0 2, p. 102-105, 1991.

BOTTONE, E. J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 382-298, 2010.

BOUMBA, V. A.; VOUTSINAS, L. P.; PHILIPPOPOULOS, C. D. Composition and nutritional value of commercial dried whey products from Feta cheese manufacture. *International Journal of Dairy Technology*, 54 (4), 141-145, 2001.

BOZA JJ, MOËNNOZ D, VUICHOUD J, JARRET AR, GAUDARD-DE-WECK D, BALLÈVRE, O. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur J Nutr*; 39: 237-43, 2000.

BRAGA, A.L.M.; MENOSSI, M.; CUNHA, R.L. The effect of the glucono- δ -lactone/caseinate ratio on sodium caseinate gelation. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 389-398, 2006.

BRANS, G.; SCHRO"EN, C.G.P.H.; VAN DER SMAN, R.G.M.; BOOM, R.M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *J. Memb. Sci.*, v. 243, p. 263-272, 2004.

BRITO, M.A.; GONZÁLEZ, F.D.; RIBEIRO, L.A.; CAMPOS, R.; LACERDA, L.; BARBOSA, P.R.; BERGMANN, G. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 942-948, 2006.

CÂNDIDO, L.M.B. Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de tilápia do Nilo (*Oreochromus niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcionais [tese]. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, 1998.

CAPOBIANGO, M.; SILVA, V.D.M.; MACHADO, M.A.A.; COELHO, J.V.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Ação da corolase pp e uso do carvão ativado na obtenção de hidrolisados proteicos de fubá de milho com baixo teor de fenilalanina. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, v. 21, p. 259-266, 2006.

CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENTE, D. *Proteínas alimentarias: bioquímica, propiedades funcionales, valor nutricional, modificaciones químicas*. Zaragoza: Acribia; 1989.

CHEN, H.M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; NOKIHARA, K. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidant peptide isolated from digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2619-2623, 1996.

CHERYAN, M. "Ultrafiltration and microfiltration handbook", 2nd Edition. CRC Press, United States of America, 1998.

CHEUNG, L.M.; CHEUNG, P.C.K. and OOI, V.E.C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem.*, 81: 249-255, 2003.

CHOBERT, J-M.; SITOBY, M. Z.; WHITAKER, J. R. Solubility and emulsifying properties of caseins modified enzymatically by *Staphylococcus aureus* V8 protease. *J. Agric. Food Chem.*, v. 36, n. 1, p. 220-224, 1988a.

CHOBERT, J-M.; BERTRAND-HARD, C.; NICOLAS, M-G. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *J. Agric. Food Chem.*, v. 36, n. 5, p. 883 – 892, 1988b.

CLARE, D. A.; SWAISGOOD, H. E. Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p.1187–1195, 2000.

CONTRERAS, M. M.; CARRÓN, R.; MONTERO, M. J.; RAMOS, M., & RECIO, I. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19, 566-573, 2009.

CORRÊA, G. F.; OSÓRIO, M. T. M.; ÁRIAS, F. P.; SOSA, L.; KREMER, R.; OSÓRIO, J. C. S.; VILANOVA, M. S. Produção e composição química do leite de ovelhas Corriedale ordenhadas mecanicamente. *Veterinária Notícias, No Prelo*, v. 12, p. 33- 39, 2006.

DAUFIN, G.; GEZAN-GUIZIOU, G.; DRESCH, M.; MANEM, J.; CHAUFER, B.; MERIN, U. Traitement et recyclage des effluents de l'industrie laitière in *Les séparations par membrane dans les procédés de l'industrie laitière*. Ed. Tec. Doc. Paris, p.343-371, 1998.

DRYÁKOVÁ, A.; PIHLANTO, A.; MARNILA, P.; ČURDA, L.; KORHONEN, H. J. T. Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *Eur. Food Res. Technol.*, v. 230, p. 865-874, 2010.

DUARTE, A.J.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Propriedades emulsionantes e solubilidade da caseína bovina e de seus hidrolisados tripticos: 2. efeito da adição de NaCl. *Ciência Tecnologia Alimentos*; 18: 302-8, 1998.

FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; VEIROS, C.; PINHO, O.; VELOSO, A.C.A.; PERES, A.M.; MENDONÇA, A. Casein Breakdown in Terrincho Ovine Cheese: Comparison with Bovine Cheese and with Bovine/Ovine Cheeses. *Journal of Dairy Science*, v. 89, n. 7, p. 2397-2407, 2006.

FITZGERALD, R. J.; MURRAY, B. A.; WALSH, D. J. Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition*, v. 134, p. 980S-988S, 2004.

FOX, P.F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, v. 18, p. 677-684, 2008.

GINGER, M. R., and M. R. GRIGOR. Comparative aspects of milk caseins. *Comp. Biochem. Physiol. B* 124:133–145, 1999.

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, 2004.

GOMEZ-RUIZ, J.A.; RAMOS, M., & RECIO, I. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal*, 14, 1075-1080, 2004.

GONZÁLEZ SISO, M. I. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresour. Technol.* 57:1–11, 1996.

GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSKI, Jr., M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v. 71, n. 1, p. 65-69, 1986.

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

HALL, C.A. & CUPPET, S.L. Structure activities of natural antioxidants. In: *Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concepts*. Aruoma 01, Cuppet SL (eds). Champaign, IL, pp. 2-29, 1997.

HAMBRAEUS, L. Importance of milk proteins in human nutrition: physiological aspects. In: Galesloot T. E. & Tinbergen B. J. *Milk Proteins*. Pudoc Wageningen, 84, 63-79, 1984.

HARAGUCHI, F.K.; ABREU, W.C.; De PAULA, H. Proteínas do soro de leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Revista de Nutrição*;19(4):479-88, 2006.

HORTON, B.S. Commercial utilization of minor milk components in the health and food industries. *J. Dairy Sci.* 78 (11), 2584-2589, 1995.

ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; TSUDA, H. Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and other antioxidants. *Crit. Rev. Toxicol.*, v. 15, p. 109-150, 1985.

JANDAL, J.M. Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Rum. Research*, 22, 177-185, 1996.

JIANG, J.; CHEN, S.; REN, F.; LUO, Z.; & ZENG, S. S. Yak milk casein as a functional ingredient: preparation and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Dairy Research*, 74, 18-25, 2007.

JOHNVESLY, B. & NAIK, G.R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry*, London, v. 37, p. 139-144, 2001.

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

JOVANOVIĆ, S.; BARAC, M.; MACEJ, O. Whey proteins-properties and possibility of application. *Mljedarstvo*, v. 55, p. 215-233, 2005.

KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R. C. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut*, v. 26, p. 907 - 913, 1985.

KILARA, A., & PANYAM, D. Peptides from milk proteins and their properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 607–633, 2003.

KINSELLA, J. E.; WHITEHEAD, D. M. Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. In: Kinsella J. E. *Advance in food and nutrition research*, vol 33 (3), 343-438. Academic Press, Harcourt Brace, Jovanovich Publishers, San Diego. 1989.

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, 1309–1323, 2003.

KORHONEN, H., PIHLANTO, A. Food derived bioactive peptides opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical*, 9, 1297-1308, 2003.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 945–960, 2006.

KORHONEN, H., & PIHLANTO, A. Bioactive peptides from food proteins. In Y. H. Hui (Ed.), *Handbook of food products manufacturing* (pp. 5–37). Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons Inc. 2007a.

KOROLCZUK, J. Voluminosity and viscosity of casein solutions. 1. The correlation between voluminosity, protein concentration and viscosity. *Milchwissenschaft*, v. 36, p. 414, 1981.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, v. 17, p. 561-594, 1999.

KUMAR, A.G. et al. Characterization of an alkaline active – thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v.104, p.411-419, 2008.

LAUZURICA, S.; DE LA FUENTE, J.; DÍAZ, M. T.; ÁLVAREZ, I.; PÉREZ, C.; CAÑEQUE, V. Effect of dietary supplementation of vitamin E on characteristics

of Lamb meat packed under modified atmosphere. *Meat Science*, 70, 639-646, 2005.

LIGNITTO, L.; CAVATORTA, V.; BALZAN, S.; GABAI, G.; GALAVERNA, G., NOVELLI, E. SFORZO, S.; SEGATO, S. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago d'allevato cheese. *International Dairy Journal*, v. 20, p. 11–17, 2010.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. and RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAES, W.; VAN CAMP, J.; VERMEIRSSSEN, V.; HEMERYCK, M., KETELSLEGERS, J. M.; SCHREZENMEIER, J., *et al.* Influence of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells. *Regulatory Peptides*, 118, 105–109, 2004.

MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *J. Am. Oil Chem.Soc.*, v. 69, p. 1163 - 1169, 1992.

MAUBOIS, J. L.; LÉONIL, J. Peptides du lait à activité biologique. *Lait*, 69, 245-269, 1989.

MCGANN, T.; DONNELLY, W.; KEARNEY, R.; BUCHHEIM, W. Composition and size distribution of bovine casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 630, p. 261-270, 1980.

MCCANN, K.B.; SHIELL, B.J.; MICHALSKI, W.P.; LEE, A.; WAN, J.; ROGINSKI, H.; COVENTRY, M.J.: Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine aS1-casein. *Int Dairy J*; 16:316-323, 2006.

MEISEL, H.: Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Curr Med Chem*; 12:1905-1919, 2005.

MINAGAWA, E.; KAMINOGAWA, S.; TSUKASAKI, F.; YAMAUCHI, K. Debittering mechanism in bitter peptides of enzymatic hydrolysates from milk casein by aminopeptidase T. *J. Food Sci.*, v.54, p.1225-1229, 1989.

MÖLLER, N. P.; SCHOLZ-AHRENS, K. E.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, v. 47, p. 171–182, 2008.

MORAIS, H.A.; DE MARCO, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alim.*, v. 34, n. 1, p. 59-69, 2005.

MORR, C. V.; HA, E.Y.W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *CRC, critical reviews in food science and nutrition*, 33, 431-476, 1993.

MULLALLY, M. M.; MEISEL, H., & FITZGERALD, R. J. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *International Dairy Journal*, 7(5), 299–303, 1997a.

MULLALLY, M. M.; MEISEL, H., & FITZGERALD, R. J. Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine b-lactoglobulin. *FEBS Letters*, 402(2–3), 99–101, 1997b.

NEHETE, P.N.; SHAH, V.D.; KOTHARI, R.M. Profiles of alkaline protease production as a function of composition of the slant, age, transfer and isolate number and physiological state of culture. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v. 7, p. 413-418, 1985.

NESPOLO, C. R. ; CORREA, A. P. F. ; RITTER, A. C. ; BRANDELLI, A. . Comparison of Fascal cheese produced with commercial or autochthonous cultures.. *International Journal of Dairy Technology (Print)*, v. 63, p. 387-395, 2010.
NEVES, B.S. Aproveitamento de subprodutos da indústria de laticínios. In: *Embrapa Gado de Leite. Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar*, p. 97-108, 2001.

PAGE, M.J.; DI CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell Mol. Life Sci.*;65:1220–1236, 2008a.

PAGE, M.J.; DI CERA, E. Evolution of peptidase diversity. *J. Biol. Chem.*;283:30010–30014, 2008b.

PARK, Y.W. Rheological characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1-2): 73-87, 2007.

PARK, Y.W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G.F.W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, London, v. 68, n. 1-2, p. 88-113, 2007.

PARKIN, K. L.; & DAMODARAN, S. Oxidation of food components. *Encyclopedia of food science and nutrition*, 4288, 4294, 2003.

PEARCE, R.J. Food functionality success or failure for dairy based ingredients. *Aust. J. Dairy Technol.*, v. 50, n. 1, p. 15-23, 1995.

PHILANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int. Dairy J.* 16, 1306-1314, 2006.

PIHLANTO, A., & KORHONEN, H. Bioactive peptides and proteins. In S. L. Taylor (Ed.), *Advances in food and nutrition research*, Vol. 47 (pp. 175–276). San Diego, USA: Elsevier Inc. 2003.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; ROKKA, T.; KORHONEN, H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*, v. 8, p. 325–331, 1998.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Bioactive peptides Derived From Bovine Whey Proteins: Opioid And Ace-inhibitory Peptides. *Trends in Food Science & Technology* 11, 347-356, 2001.

PITKOWSKI, A.; DURAND, D.; NICOLAI, T. Structure and dynamical mechanical properties of suspensions of sodium caseinate. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 326, p. 96-102, 2008.

PRIPP, A. H.; SØRENSEN, R.; STEPANIAK, L.; SØRHAUG, T. Relationship between proteolysis and angiotensin-I-converting enzyme inhibition in different cheeses. *LWT*, v. 39, p. 677–683, 2006.

PONSANO, E.H.G.; PINTO, M.F.; CASTRO-GOMEZ, R..JH. Soro de leite – obtenção, características e aproveitamento: revisão. *Seminário Ciências Agrárias*; 13: 92-96, 1992.

POPOVICI, S. T.; SCHOENMAKERS, P. J. Fast size-exclusion chromatography – Theoretical and practical considerations. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 1099, p. 92-102, 2005.

POWNALL, T. L.; UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *J. Agric. Food Chem.*, v. 58, p. 4712-4718, 2010.

RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H.G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chem.*, v. 117, p. 582-588, 2009.

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

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*, v.290, p.205-218, 1993.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; PARK, Y.W.; GAUCHERON, F.; BOUHALLAB, S. Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, v. 68, p. 207-220, 2007a.

REED, G. *Enzymes in food processing*. 2 ed. London: Academic Press, 573 p., 1975.

RERAT, A.A. Nutritional supply of proteins and absorption of their hydrolysis products: consequences on metabolism Pro. Nutr. Soc., 52: 335-44, 1993.

RHODES, J. C. *Aspergillus fumigatus*: growth and virulence. Medical Mycology, 44, S77-S81, 2006.

RIBEIRO, L. C.; PÉREZ, J. R. O.; CARVALHO, P. H. A.; SILVA, F. F.; MUNIZ, J. A.; JÚNIOR, G. M. O.; SOUZA, N. V. Produção, composição e rendimento em queijo do leite de ovelhas Santa Inês tratadas com ocitocina. Revista Brasileira de Zootecnia, v.36, n.2, p.438-444, 2007.

RICHARDS, N.S.P.S. Emprego racional do soro láctico. Indústria de Laticínios, p. 67-69, maio/junho, 1997.

RISSO, P.H.; RELING, V.M.; ARMESTO, M.S.; PIRES, M.S.; GATTI, C.A. Effect of size, proteic composition, and heat treatment on the colloidal stability of proteolyzed bovine casein micelles. Colloid and Polymer Science, v. 285, n. 7, p. 1435-1536, 2007.

RIVAL, S. G.; BOERIU, C. G.; & WICHERS, H. J. Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 295-302, 2001.

RIZZELLO, C. G.; LOSITO, I.; GOBBETTI, M.; CARBONARA, T.; DE BARI, M. D.; & ZAMBONIN, P. G. Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. Journal of Dairy Science, 88, 2348–2360, 2005.

ROMAN, J.A.; SGARBIERI, V.C. Obtenção e caracterização química e nutricional de diferentes concentrados de caseína. Revista de Nutrição, Campinas, v. 18, n. 1, p. 75-83, 2005.

RUIS, H.G.M.; VENEMA, P.; LINDEN, E. Relation between pH-induced stickiness and gelation behaviour of sodium caseinate aggregates as determined by light scattering and rheology. Food Hydrocolloids, v. 21, p. 545-554, 2007.

SÁ, C.O.; SIQUEIRA, E.R.; SÁ, J.S.; FERNANDES, S. Influência do fotoperíodo no consumo alimentar, produção e composição do leite de ovelhas Bergamácia. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 40, n. 6, p. 601-608, 2005.

SABADINI, E.; HUBINGER, M.D.; CUNHA, R.L. The effects of sucrose on the mechanical properties of acid milk proteins- κ -carrageenan gels. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 23, n. 1, p. 55-65, 2006.

SAHA B. C. & HAYASHI K. Research review paper Debittering of protein hydrolysates *Biotech. Adv.*, v. 19 p. 355-370, 2001.

SAITO, T.; NAKAMURA, T.; KITAZAWA, H.; KAWAI, Y.; & ITOH, T. Isolation and Structural Analysis of Antihypertensive Peptides That Exist Naturally in Gouda Cheese. *Journal of Dairy Science*, 83, 1434–1440, 2000.

SANCHEZ, S.; DEMAINE, A.L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. *Organic Process Research & Development*, Washington, v.15, p.224-230, 2011.

SANTOS, C.T.; COSTA, A.R.; FONTAN, G.C.R.; FONTAN, R.C.I.; BONOMO, R.C.F. Influência da concentração de soro na aceitação sensorial de bebida láctea fermentada com polpa de manga. *Alimentos e Nutrição*, v.19, n.1, p.55-60, 2008.

SARMADI, B. H.; & ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31, 1949-1956, 2010.

SCOPES, R. K. Protein purification: principles and practice. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 1994.

SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 1996.

SGARBIERI, VALDEMIRO C. Propriedades fisiológico-funcionais das proteínas do soro de leite. *Revista de Nutrição*, v. 17, n. 4. p. 397-409. Oct- Dec, 2004.

SHIH, F. F.; DAIGLE, K. W. Antioxidant proprieties of milledrice co-products and their effects on lipid oxidation in group beef. *Journal Food Science*, 68, 2672-2675, 2003.

SHIMIZU, M. Food-derived peptides and intestinal functions. *BioFactors*, 21, 43–47, 2004.

SILVA, J. G. ; MORAIS, H. A. ; SILVESTRE, M.P.C. Comparative study of the functional properties of bovine globin isolates and sodium caseinate. . *Food Res. Inter.*, v. 36, n. 1, p. 73-80, 2003a.

SILVA, J. G. ; MORAIS, H. A.; OLIVEIRA, A. L. ; SILVESTRE, M.P.C. Evaluating the incorporation of globin bovine and sodium caseinate on the raw batter quality and on the stability of ham pâté. *Meat Sci.*, v. 63, n. 2, p. 177-184, 2003b.

SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Functional properties of bovine plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *Food Sci. Technol.*, v. 37, n. 6, p. 709- 718, 2003c.

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

SILVA, S. V., PIHLANTO, A., & MALCATA, F. X. Bioactive peptides in ovine and caprine cheeselike systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*. *Journal of Dairy Science*, 89, 3336-3344, 2006.

SILVESTRE, M.P.C.; HAMON, M.; YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, n. 12, p. 2778-2782, 1994a.

SILVESTRE, M.P.C.; HAMON, M.; YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, n. 12, . 2783-2789, 1994b.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chem.*, v. 101, p. 1484-1491, 2007.

SOUZA, A.C.K.O.; OSÓRIO, M.T.M.; OSÓRIO, J.C.S.; OLIVEIRA, N.M.; VAZ, C.M.S.; SOUZA, M.; CORRÊA, G.F. Produção, composição química e características físicas do leite de ovinos da raça Corriedale. *Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas*, v.11, n. 1, p. 73-77, 2005.

SRINIVAS, S., & PRAKASH, V. Bioactive peptides from bovine milk α -casein: isolation, characterization and multifunctional properties. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 16, 7-15, 2010.

STUBBS, A.; ABUD, G.; BENCINI, R. Dairy Sheep Manual – Farm Management Guidelines. Kingston: RIRDC, 69 p, 2009.

SUÁREZ, V.H.; Busetti, M.R. Lechería Ovina en la Argentina. *Boletín de Divulgación Técnica INTA*, v. 90, p. 195-204, 2006.

SUETSUNA, K.; UKEDA, H.; & OCHI, H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 128–131, 2000.

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

TORRUCO-UCO, J. G.; DOMÍNGUEZ-MAGAÑA, M. A.; DÁVILA-ORTÍZ, G.; MARTÍNEZ-AYALA, A.; CHEL-GUERRERO, L. A.; BETANCUR-ANCONA, D. A. Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, v. 6, n. 2, p. 158-168, 2008.

TRIPATHI, R.; MOHAN, H.; KAMAT, J.P. Modulation of oxidative damage by natural products. *Food Chem.*, 100: 81-90 2007.

VIANA, F.R.; DELVIVO, F.M. ; BIZZOTTO, C.S.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Quality of ham pâté incorporated of bovine globin and plasma as fat replacers. *Meat Sci.*, v. 70, n. 1, p. 153-160, 2005.

VIANA, F.R.; BIZZOTTO, C.S.; DIAS, D. R. ; SILVESTRE, M.P.C. Effect of different parameters on the quality of meat emulsions. *Food Technol. Biochem.*, v. 42, n. 1, p. 5-10, 2004.

VIJAYALAKSHIMI, M.A.; LEMIEUX, L.; AMIOT, J. High performance size exclusion liquid chromatography of small molecular weight peptides from protein hydrolysates using methanol as a mobile phase additive. *J. Liq. Chromatogr.*, v. 9, p. 3559-3576, 1986.

VILJANEN, K.; KIVIKARI, R.; HEINONEN, M. Inhibition of Protein and Lipid Oxidation in Liposomes by Berry Phenolics . *Journal of Agricultural and Food Chemistry - J AGR FOOD CHEM* , vol. 52, no. 24, pp. 7419-7424, 2004.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; BOEKEL, M. A. J. S. *Ciência de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza: Editorial Acibia, 729 p. 2001.

WEST, D.W. Structure and function of the phosphorylated residues of casein. *Journal of Dairy Research*, v. 53, p. 333-352, 1986.

WISEMAN, A. *Manual de biotecnología de los enzimas*, Espanha, Zaragoza: Acibia, p. 444, 1991.

YAMAMOTO, N., AKINO, A., & TAKANO, T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 77, 917–922, 1994.

YU, C. M.; MUN, S.; WANG, N. H. L. Theoretical analysis of the effects of reversible dimerization in size exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 1132, p. 99-108, 2006.

XUE,Z.; YU, W.; LIU, Z.; WU, M.; KOU, X.; WANG, J. Preparation and Antioxidative Properties of a Rapeseed (*Brassica napus*) Protein Hydrolysate and Three Peptide Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 5287–5293, 2009.

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

ZHU, Y. P., FAN, J. F., CHENG, Y. Q., & LI, L. T. Improvement of the antioxidant activity of Chinese traditional fermented okara (Meitauza) using *Bacillus subtilis* B2. *Food Control*, 19, 654-661, 2008.

ZHU, Z., QIU, N., & YI, J. Production and characterization of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernel protein hydrolysate. *European Food Research and Technology*, 231, p.13-19, 2010.

ZYDNEY A. L. Protein separations using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation. *Int. Dairy Journal*, 8, 243-250, 1998.

