

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Seleção de Microrganismos Produtores de Hidrolases para Produção de Hidrolisados Vegetais Aplicados a Cosméticos

Lima, L.M.¹; Sousa, V.S.¹; Cardoso, V.S.¹; Mansoldo, F.R.P.¹; Vermelho, A.B.¹; Mazotto, A.M.¹

¹Laboratório Bioinnovar – Unidade de Biocatálise, Bioprodutos e Bioenergia, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ - E-mail: mafra.ufirj@gmail.com

RESUMO

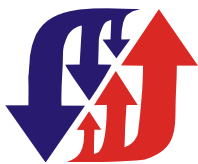
As enzimas são potencias ferramentas para processos industriais, pois, realizam transformações químicas muito específicas, no entanto, apesar das enzimas comerciais produzidas por microrganismos vir ganhando espaço, há poucos esforços na utilização de processos fermentativos na obtenção de hidrolisados para cosméticos. Neste trabalho, 27 amostras da coleção de cultura de microrganismos do laboratório Bioinnovar, foram avaliadas quanto à produção de peptidases, celulases, lipases e amilases, através da detecção de zona de hidrólise em ágar contendo substratos específicos. Das 27 amostras analisadas, 17 produziram peptidases, 20 produziram lipases e 27, esterases, 16 amostras produziram celulases e 12 produziram amilases. Dentre as amostras avaliadas B3, EL06, B2, EL05 e Lã P8 foram selecionadas para a produção de hidrolisados a partir de proteína de soja. As melhores cepas em relação à produção de proteína foram B2, EL05 e EL06 e, relacionadas a produção de peptidases EL06 e B2, respectivamente.

Palavras-chaves: hidrolisados, proteína de soja, peptidases, hidrolases

INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior mercado mundial de cosméticos, e segundo maior consumidor mundial no segmento de produtos para cabelo, com faturamento em 2014 de R\$ 21,2 bilhões. As proteínas têm sido utilizadas em produtos cosméticos há bastante tempo, entretanto, a utilização de hidrolisados de proteínas de origem vegetal é relativamente recente (Ścibisz et al., 2008). As proteínas compõem um dos principais grupos de princípios ativos utilizados em cosméticos voltados para o cuidado de pele e cabelos. Os hidrolisados podem ser obtidos via hidrólise ácida ou enzimática. A hidrólise química, geralmente utilizando ácido clorídrico ou sulfúrico, leva a perda total ou parcial de alguns aminoácidos como triptofano, tirosina, serina e treonina. Por este motivo, a hidrólise enzimática, que é conduzida em condições mais amenas, é uma alternativa à hidrólise química.

A maioria dos processos enzimáticos utilizados atualmente utiliza enzimas animais e vegetais como a pepsina, papaína, bromelina e quimotripsina. Enzimas comerciais produzidas por microrganismos vêm ganhando espaço, entretanto há poucos esforços na utilização de processos fermentativos na obtenção de hidrolisados para cosméticos (Villa et



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

al., 2013). Enzimas são catalisadores biológicos que aceleram diversas reações químicas requeridas para a vida, estando assim envolvidos em processos essenciais. A capacidade das enzimas de realizarem transformações químicas muito específicas faz delas ferramentas úteis a diferentes processos industriais. Neste trabalho, 27 amostras da coleção de cultura de microrganismos do laboratório Bioinovar - Unidade de Biocatálise, Bioprodutos e Bioenergia, foram avaliadas quanto à produção de peptidases, celulases, lipases e amilases (Vermelho et al., 1996). Destas amostras, aquelas que apresentaram as melhores produções de peptidases foram selecionadas para produção de hidrolisados de proteína soja obtidos por processo fermentativo. Estas amostras foram investigadas quanto à produção de peptidases e peptídeos provenientes da hidrólise da proteína da soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção de microrganismos produtores de hidrolases

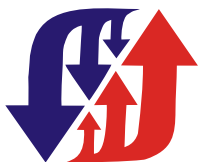
Visando a seleção de microrganismos produtores de peptidases, amilases, celulases e lipases, 27 cepas da coleção de cultura laboratório Bioinovar foram cultivadas em diferentes meios específicos para observação da formação de zona de hidrólise. Os meios caseína (leite em pó desnatado), CMC, amido, Tween 20 e Triburina foram utilizados para observação de peptidases, celulases, amilases, lipases e esterases, respectivamente. O experimento foi conduzido todo em triplicata. Foram inoculados 20 μ L de uma suspensão das amostras em cada poço do ágar. As placas foram incubadas durante 72 horas a 27°C/28°C, exceto as placas com meio caseína que foram incubadas por 24 horas. Após a incubação, foi feita a medida dos halos – zona de hidrólise. Para o meio de amido e CMC foi necessário utilizar corante como Lugol e Vermelho Congo, respectivamente.

Produção de hidrolisados e peptidases utilizando proteína de soja

Os microrganismos selecionados (cepas B3, EL06, B2 e EL05) foram cultivados em meio extrato de levedura (extrato de levedura 0,5%, peptona 0,5%, KCl, 2% e sacarose 2%) por 24 horas a 28°C, 200 rpm, para obtenção de massa celular. As células foram lavadas (4000 rpm/ 20 min) e inoculadas em meio soja (proteína de soja 1%, extrato de levedura 0,1%, Na₂HPO₄ 0,04M, KH₂PO₄ 0,06, pH 7,2, MgSO₄ 0,02%, CaCl₂ 0,01%, MnCl₂ 0,001%, ZnCl₂ 0,001%). Após incubação por 5 dias a 28°C agitando a 200 rpm, o meio fermentado foi submetido a centrifugação (4000/ 20 min) e o sobrenadante de cultura foi analisado quanto a concentração de peptídeos (Lowry et al., 1951) e presença de peptidases (Jones et al., 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

As suspensões das amostras foram inoculadas em poços em ágar contendo substratos como leite em pó desnatado (caseína), carboximetil celulose, triburina e Tween 20, ou amido, respectivamente, para a observação de zona de hidrólise. Após 24h de incubação as medidas das zonas de hidrólise de caseína foram obtidas e observou-se que, das 27 amostras analisadas, 17 produziram peptidases (Figura 1). Destacaram-se na produção de peptidases as amostras B3, EL06, B2, EL05 e LãP8, que foram selecionadas para cultivo em meio contendo soja como principal substrato. Para a detecção de lipases, foi medida a zona transparente em



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

placas contendo Tween 20 ou Tributirina. Observamos que das 27 amostras apenas 4 não degradaram a Tributirina (Fabi 16, LãP2, LãP14 e LãP16), enquanto 14 degradaram Tween 20 (Figura 2). Este resultado mostra a especificidade do Tween 20 para lipases que hidrolisam ácidos graxos de cadeia longa. Quanto à produção de carbohidrolases, observadas pela formação de zona de hidrólise em ágar contendo amido ou carboximetilcelulose, 16 amostras produziram celulases e 12 produziram amilases (Figura 3).

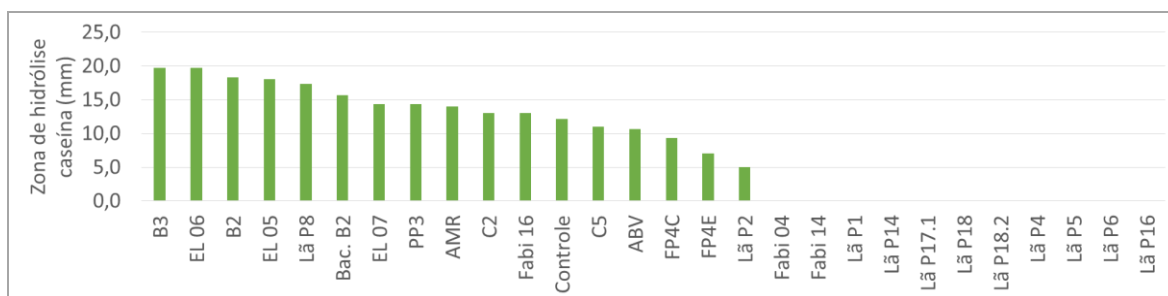


Figura 1: Medida da zona de hidrólise da caseína.

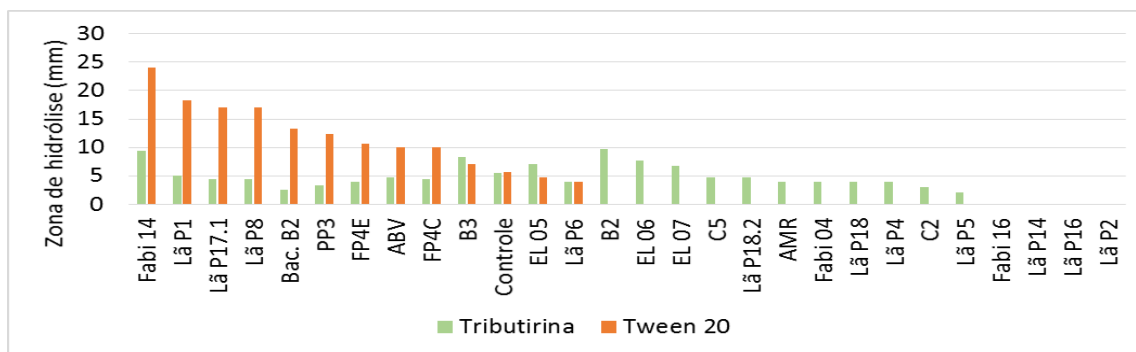


Figura 2: Medida da zona de hidrólise para enzimas lipolíticas

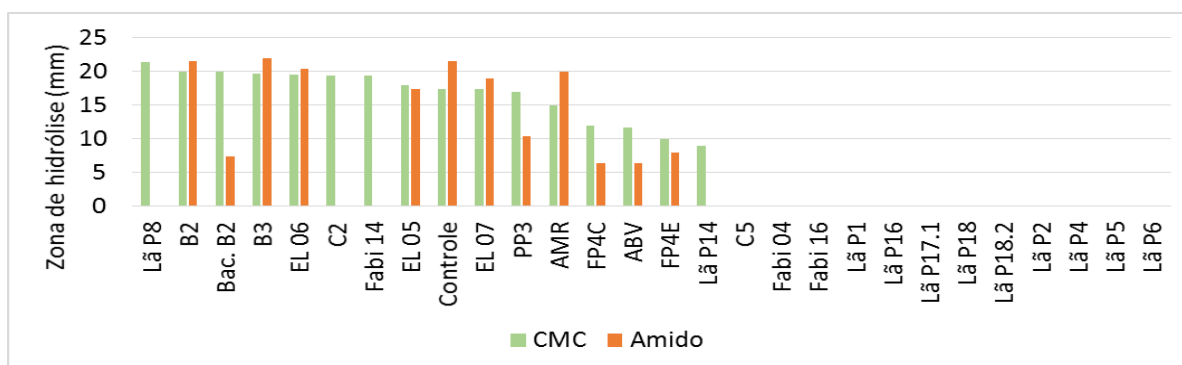
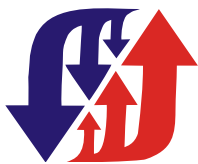


Figura 3: Medida da zona de hidrólise para carbohidrolases

Devido aos resultados obtidos para a produção de peptidases, as amostras B3, EL06, B2, EL05 e LãP8, isoladas de resíduos avícolas e lã de carneiro, foram selecionadas para avaliação do potencial de hidrólise de proteínas de soja. Estas amostras foram cultivadas em meio contendo soja por 5 dias e a concentração de peptídeos no sobrenadante foi mensurada. Concomitantemente, a produção de peptidases também foi avaliada. Quanto à concentração de peptídeos e a presença de peptidases as amostras B2, EL05 e EL06 mostraram os melhores



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

resultados (Figura 4: A e B). O meio apresentou alta concentração de proteínas (da soja) de alta massa molecular, e após a fermentação, estas proteínas não foram mais observadas por SDS-PAGE, apontando sua degradação em peptídeos de massa inferior a 10 kDa (dado não mostrado). A avaliação desde peptídeos será realizada por espectrometria de massa.

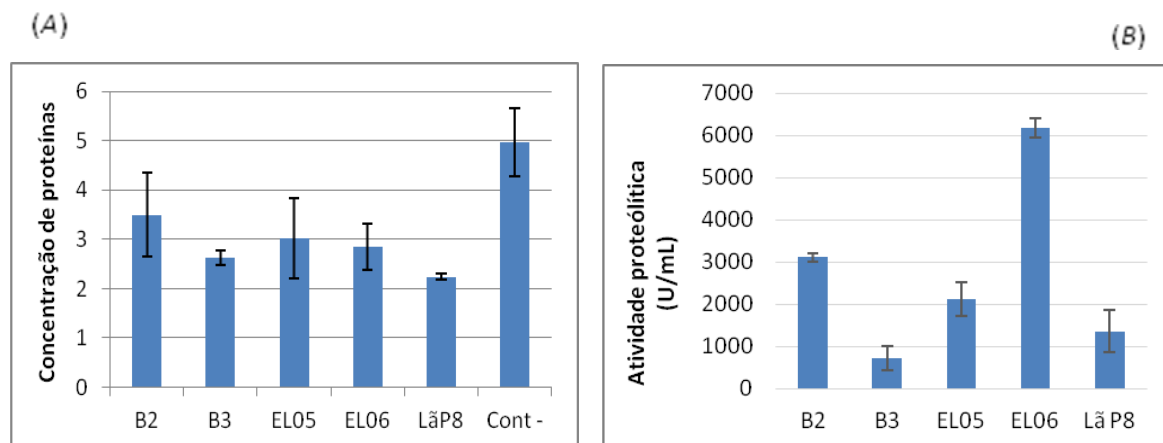


Figura 4: Concentração de proteínas (A) e atividade proteolítica (B) do sobrenadante de cultura das amostras B2, B3, EL05, EL06 e LãP8 após cultivo submerso em meio contendo proteína de soja.

CONCLUSÕES

Dentre as amostras avaliadas, B3, EL06, B2, EL05, Lã P8 apresentaram as maiores zonas de hidrólise em caseína, além de produzirem as demais enzimas. Estas amostras foram selecionadas para hidrólise biológica de proteína de soja. Estas amostras, especialmente B2, EL05 e EL06, se mostraram promissoras para produção de hidrolisados de soja por processo fermentativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J.; Farr, A. L., Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1), 267-275, 1951.

Jones, L. B., Fontamini, D., Jarvinen, M., Pekkarinen, A. Simplified endoproteinase assays using gelatin or azogelatin. *Analytical Biochemistry*, 263, 214-220, 1998.

Ścibisz, M., Arct, J., Pytkowska, K., 2008. Hydrolysed proteins in cosmetics production. *SÖFW-Journal Wydanie Polskie*, 1, 3-2008.

Vermelho, A.B. Meirelles, M.N.L., Lopes, A., Petinate, S.D.G., Chaia, A. A., Branquinha, M.H. 1996. Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(6): 755-76.

Villa, A.L. V., Aragão, M.R.S., Santos, E.P., Mazotto, A.M., Zingali, R.B., Souza, E.P., Vermelho, A.B. 2013. Feather keratin hydrolysates obtained from microbial keratinases: effect on hair fiber. *BMC Biotechnol* 13:15. doi: 10.1186/1472-6750-13-15