

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Hidrolisados Proteicos de Aveia: Otimização da Produção de Hidrolisados Proteicos em Meio Suplementado com Aveia

SOUSA, V. S.¹, TIBÚRCIO, S. R. G., MAZOTTO, A. M.¹ & VERMELHO, A. B.¹

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
Av. Carlos Chagas Filho, 373, CCS, Bloco I, sala 31, Ilha do Fundão - Rio de Janeiro - RJ
CEP 21941-902 - Tel: +55 21 3938-6743 - E-mail: nessa_linkin@hotmail.com

RESUMO

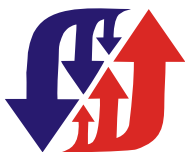
*O processo de hidrólise por peptidases consiste na quebra das moléculas de proteínas em peptídeos de baixa massa molecular. A hidrólise enzimática apresenta uma série de vantagens sobre a hidrólise química por ser uma metodologia ecologicamente correta, não poluente e produzir, geralmente, um produto incolor e totalmente orgânico. Este trabalho teve como objetivo o melhoramento do processo de obtenção de hidrolisados proteicos usando como substrato aveia. As três cepas analisadas apresentaram resultados satisfatórios quanto à produção de hidrolisados proteicos em meio suplementado com aveia. De acordo com os resultados obtidos através da dosagem de proteínas podemos concluir que o melhor resultado foi para cepa *Bacillus licheniformis* (LFB-FIOCRUZ 1269).*

Palavras-chave: hidrolisados, aveia, hidrólise enzimática, peptidases.

INTRODUÇÃO

O processo de hidrólise por peptidases consiste na quebra das moléculas de proteínas em peptídeos de baixa massa molecular e em aminoácidos. As peptidases têm grande importância biológica, médica e biotecnológica, e constituem um produto com alto valor agregado, podendo participar de diversos processos industriais, dentre eles estão a indústria de detergentes, alimentícia, farmacêutica, entre outras. As peptidases correspondem a aproximadamente 60% do total de enzimas no mercado mundial e cerca de 40% das peptidases comercializadas são de origem microbiana. Destas, destacam-se as peptidases alcalinas produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*, cujas aplicações têm aumentado acentuadamente devido à capacidade de produção destes microrganismos e a alta atividade catalítica das peptidases por eles produzidas (Joo e Chang, 2006). A hidrólise enzimática apresenta uma série de vantagens sobre a hidrólise química incluindo o fato de ser uma metodologia ecologicamente correta, não poluente e produzir um composto incolor totalmente orgânico. A obtenção de hidrolisados proteicos pode usar proteínas de origem vegetal como a soja e aveia, ou proteína animal como a queratina das penas de frango, pêlos e cascos de animais (Mazotto, 2008).

Um dos setores que mais utilizam os hidrolisados é o de cosmético tendo como alvo a indústria de produtos capilares. A maioria dos produtos cosméticos com a finalidade de melhorar hidratação, a emoliência ou a restauração das fibras capilares danificadas apresenta em sua formulação algum hidrolisado de proteína, animal ou vegetal (Villa, 2008). Este



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

trabalho teve como objetivo o melhoramento do processo de obtenção de hidrolisados proteicos usando como substrato aveia.

MATERIAL E MÉTODOS

Efeito do pH, temperatura e concentração de substrato na produção de hidrolisados proteicos e peptidases

Os peptídeos de aveia foram obtidos por hidrólise enzimática através de peptidases microbianas usando cepas de *Bacillus subtilis* (LFB- FIOCRUZ 1273), *Bacillus licheniformis* (LFB-FIOCRUZ 1269), *Bacillus subtilis* (LFB-FIOCRUZ 1267) através de fermentação submersa.

Os microrganismos foram cultivados em meio extrato de levedura (extrato de levedura 0,5%, peptona 0,5%, KCl 2,0% e sacarose 2,0%) por 24 horas a 28°C sob agitação constante (300 rpm) para obter massa celular, lavados com salina (2x 3000 rpm/20min) e inoculados em meio contendo 0,01% de extrato de levedura e diferentes concentrações de aveia (0-2), pH (5-8; tampão fosfato NaH₂PO₄ 0,06M e K₂HPO₄ 0,04M) e incubados a diferentes temperaturas conforme a tabela 1.

Tabela 1. Efeito do pH, temperatura e concentração de substrato na produção de hidrolisados proteicos e peptidases.

| Ensaio | pH | Temperatura (°C) | aveia (g/l) | Ensaio | pH | Temperatura (°C) | aveia (g/l) |
|--------|----|------------------|-------------|--------|----|------------------|-------------|
| 1 | 7 | 34 | 1 | 11 | 7 | 34 | 1 |
| 2 | 7 | 34 | 0 | 12 | 7 | 44 | 1 |
| 3 | 8 | 28 | 1,5 | 13 | 6 | 40 | 1,5 |
| 4 | 7 | 34 | 1 | 14 | 7 | 34 | 1 |
| 5 | 8 | 40 | 1,5 | 15 | 6 | 28 | 0,4 |
| 6 | 5 | 34 | 1 | 16 | 8 | 28 | 0,4 |
| 7 | 7 | 23 | 1 | 17 | 8 | 34 | 1 |
| 8 | 7 | 34 | 1 | 18 | 6 | 28 | 1,5 |
| 9 | 8 | 40 | 0,4 | 19 | 6 | 40 | 0,4 |
| 10 | 7 | 34 | 2 | 20 | 7 | 34 | 1 |

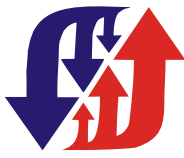
Após 5 dias de cultivo sob agitação de 300 rpm, o sobrenadante foi obtido por centrifugação a 4.000 rpm por 20 minutos e as concentrações de proteínas determinadas segundo o método de Lowry *et al.* (1951).

Validação dos resultados

Foi selecionado a melhor condição de pH e temperatura, e a partir disto foi realizada a otimização quanto à concentração de aveia, variando em 2g, 2,5g, e 3g.

Zimografia

Para a zimografia, os microrganismos foram cultivados em meio aveia (aveia 1%, extrato de levedura 0,01% e tampão fosfato pH 7). Após 5 dias de cultivo do meio fermentado foi centrifugado (4.000 rpm por 20 minutos) e aplicado em gel com substrato gelatina. A zimografia foi realizada como descrito por Mazotto *et al.*, 2010.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

RESULTADOS E DISCUSSÕES

As três cepas analisadas apresentaram resultados satisfatórios quanto à produção de hidrolisados proteicos em meio suplementado com aveia. Os melhores resultados foram obtidos, para as três cepas, quando se utilizou a concentração de 2 g de aveia no meio, e também quando o processo de fermentação se deu em 34°C em pH 7. Nestas condições a cepa 1269 apresentou 6,8 mg/ml de peptídeos, a cepa 1273 apresentou 6,7 mg/ml e a cepa 1267, 6,5 mg/ml (figura 1). A diferença entre as cepas não foi significativa, entretanto era esperado que estas apresentassem resultados semelhantes, uma vez que o perfil de peptidases produzidas por elas em meio com aveia é semelhante, como mostra a zimografia (figura 2). As cepas 1267 e 1273 apresentam o mesmo perfil proteolítico, enquanto a cepa 1269 possui um perfil de múltiplas bandas com algumas diferenças na faixa de migração entre 80-100 kDa e 30kDa aproximadamente. A semelhança entre 1267 e 1273 explica-se por serem cepas da mesma espécie.

Quando estas cepas foram cultivadas com 1% de aveia, a 34°C pH 7, as concentrações de proteínas obtidas foram de 3,9 mg/ml para as cepas 1269 e 1273, e 3,7 mg/ml para 1267, valores aproximadamente 2 vezes menores que o observado quando o meio de fermentação continha 2% de aveia. Para a validação dos resultados obtidos, as melhores condições de cultivo foram repetidas para a cepa 1269, e novas concentrações de aveia também foram avaliadas, uma vez que este se mostrou o principal fator na produção de peptídeos (Figura 3). A concentração de aveia efetivamente afeta a produção e os melhores resultados foram apresentados quando a concentração de aveia no meio era de 3g. Concentrações superiores foram também testadas, mas por dificultar a aeração do processo, foram desconsideradas (dado não mostrado).

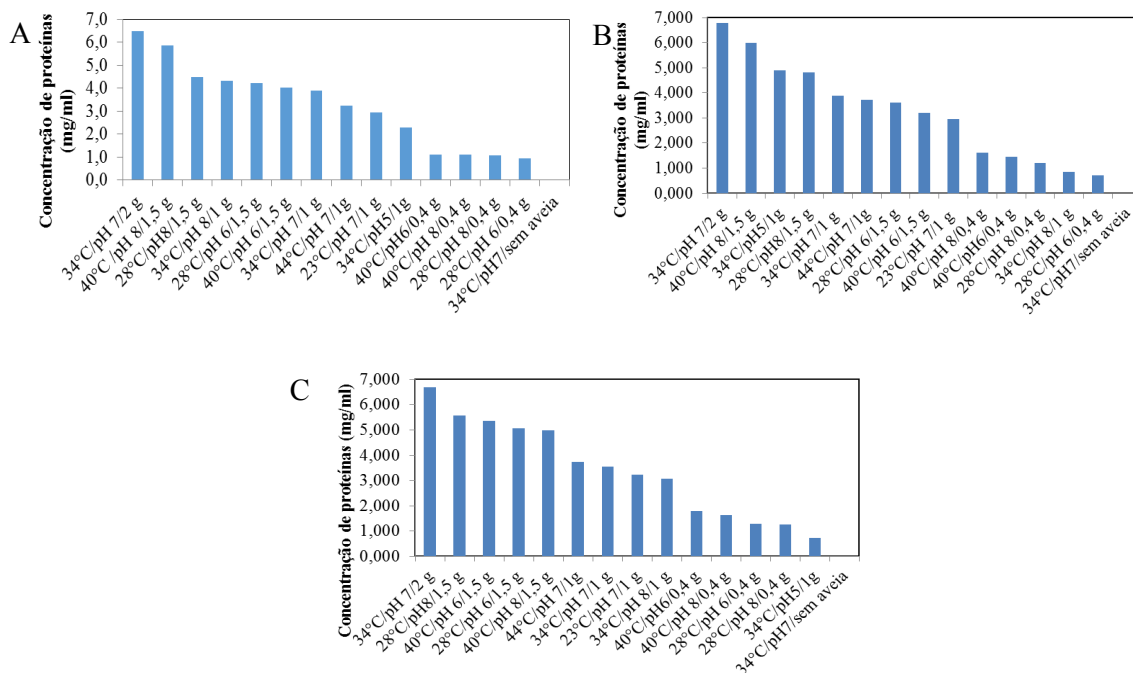
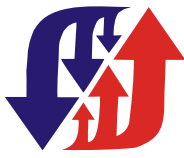


Figura 1. Concentração de proteínas em resposta à alterações de pH, temperatura e concentração de aveia das amostras *Bacillus subtilis* LFB-FIOCRUZ 1267 (A), *Bacillus licheniformis* LFB-FIOCRUZ 1269 (B), *Bacillus subtilis* LFB-FIOCRUZ 1273 (C).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

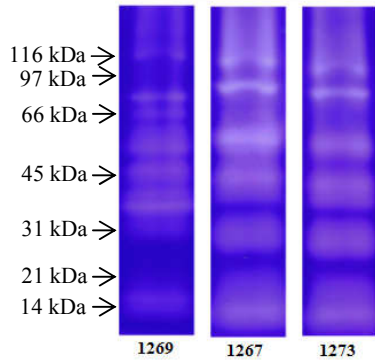


Figura 2. Zimografia mostrando diferentes bandas para cada sobrenadante obtido.

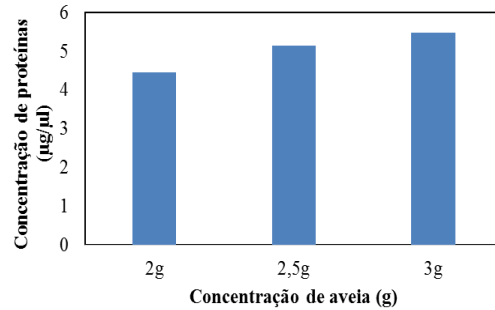


Figura 3. Concentração de em resposta a alterações de concentração de aveia.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos através da dosagem de proteínas podemos concluir que o melhor resultado foi para cepa *Bacillus licheniformis* (LFB-FIOCRUZ 1269), sendo assim as condições ótimas para obtenção de hidrolisados em meio suplementado com aveia são temperatura à 34°C, pH 7 e concentração de aveia 3g.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Joo, H.; Chang, C. **Production of an SDS-stable alkaline protease form an alkaophilic *Bacillus clausii* I-52 by submerged fermentation: Feasibility as a laundry detergent additive.** *Enz. Microbiol. Technol.*, 38: 176-183, 2006.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
- Mazotto, A. M. **Uso de queratinases para obtenção de peptídeos para ração animal.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Microbiologia Prof Paulo de Góes. Rio de Janeiro. 2008.
- Mazotto, A. M, Coelho R. R, Cedrola S.M, De Lima M.F, Couri S, Paraguai E. S, Vermelho A.B. **Keratinase Production by Three *Bacillus* spp. Using Feather Meal and Whole Feather as Substrate in a Submerged Fermentation.** *Enzyme Res.* 2011;2011:523780. doi: 10.4061/2011/523780. 2010.
- Villa, A. L. V. **Produção e aplicação de peptídeos de hidrolisado de penas de frango na cosmética capilar.** 2008. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências - Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2008.