

## 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.<sup>1</sup>, TIBÚRCIO, S. R. G., MAZOTTO, A. M.<sup>1</sup> & VERMELHO, A. B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,06M e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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).

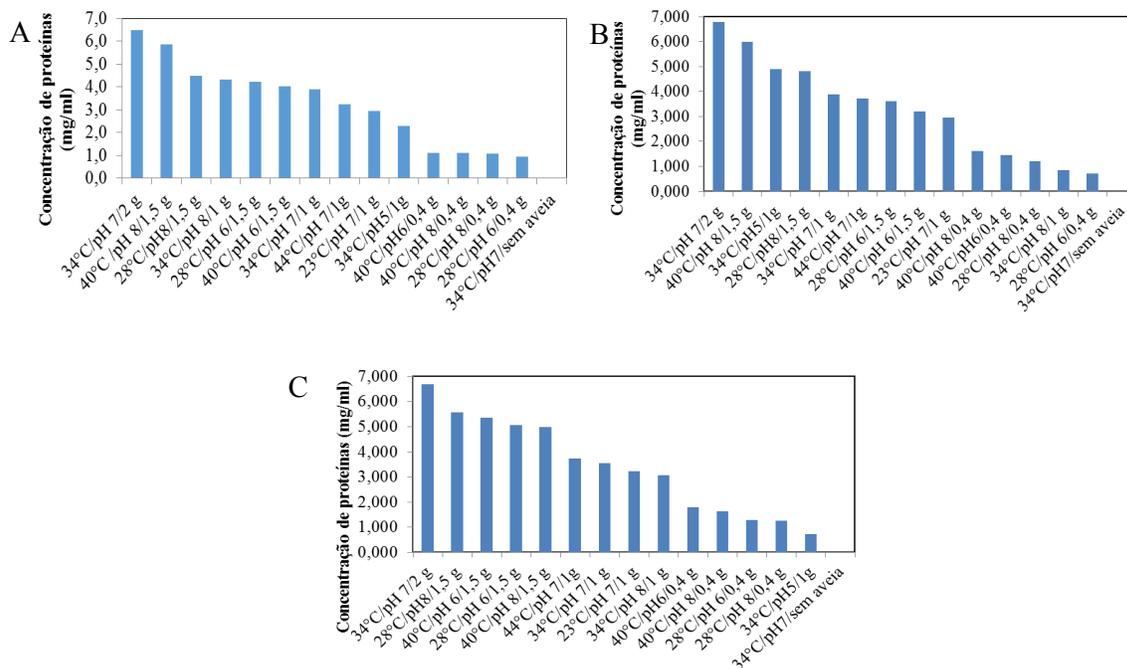
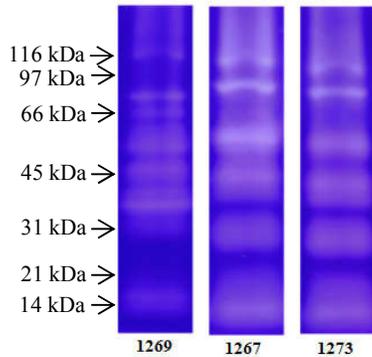


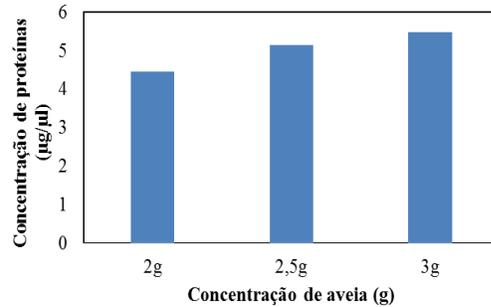
Figura 1. Concentração de proteínas em resposta à alterações de pH, temperatura e concentração de aveia das amostras *Bacillus subtilis* LFB-FIOCRUZ 1267 (A), *Bacillus licheniformis* LFB-FIOCRUZ 1269 (B), *Bacillus subtilis* LFB-FIOCRUZ 1273 (C).



## 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.