

## ENZIMÓLISE DE SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL PARA A PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS ANTIOXIDANTES

AMANDA MENDONÇA AZAMBUJA<sup>1,2\*</sup>, GABRIELA POLL MORAES<sup>3</sup>, JULIANO  
BACKES SCHERER<sup>4</sup>, DANIEL JONER DAROIT<sup>2,5</sup>

### 1 Introdução

A hidrólise enzimática de proteínas resulta em complexas misturas de peptídeos, sendo que os peptídeos liberados podem demonstrar atividades biológicas. A produção de hidrolisados proteicos antioxidantes, por exemplo, vem sendo investigada devido às potenciais aplicações dos hidrolisados na saúde humana e animal, bem como no desenvolvimento de produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (Boboua et al., 2024).

Diversas enzimas proteolíticas vêm sendo avaliadas neste sentido; contudo, proteases microbianas são especialmente promissoras, tanto pela ampla diversidade de microrganismos que pode prover enzimas com propriedades distintas, quanto pela possibilidade de obter proteases durante cultivos em meios de cultura de baixo custo (Hoffmann et al., 2024).

Biomassas proteicas de origem animal, derivadas de abatedouros e graxarias, vêm sendo recentemente exploradas como substratos para a obtenção de hidrolisados bioativos (Boboua et al., 2024). Neste panorama, a hidrólise enzimática pode representar estratégia conveniente para valorizar e ampliar a aplicabilidade destas biomassas (Alves et al., 2021).

### 2 Objetivos

Obter e aplicar uma protease bruta de origem bacteriana na produção de hidrolisados antioxidantes a partir de subprodutos de origem animal.

### 3 Metodologia

A produção de proteases por *Bacillus* sp. CL33A foi avaliada com substratos de origem

<sup>1</sup> Graduanda do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *Campus* Cerro Largo. Contato: amazambuja@hotmail.com.

<sup>2</sup>Grupo de Pesquisa: Biociências.

<sup>3</sup> Mestra em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS), UFFS, *Campus* Cerro Largo.

<sup>4</sup>Mestrando, PPG em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis, UFFS, *Campus* Cerro Largo.

<sup>5</sup>Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. UFFS, *Campus* Cerro Largo. Contato: daniel.daroit@uffs.edu.br. **Orientador.**

vegetal (farelos de canola, girassol e trigo), e farinhas de origem animal [penas, vísceras (FV) e sangue (FS)]. Cada substrato (10 g/L) e o meio mineral (50 mL;  $K_2HPO_4$ , 0,3 g/L;  $KH_2PO_4$ , 0,4 g/L; NaCl, 0,5 g/L) foram adicionados a Erlenmeyers (250 mL). Após autoclavação e resfriamento, os meios foram inoculados e incubados (30 °C, 125 rpm, 4 dias). A atividade de protease foi mensurada nos sobrenadantes de cultivo por meio de ensaios realizados utilizando azocaseína como substrato enzimático (55 °C, pH 8,0, 15 min). O substrato que induziu a maior produção de proteases foi selecionado para a obtenção da protease bruta a ser usada nos experimentos de hidrólise enzimática.

Os substratos para a hidrólise enzimática foram FV e FS. Cada subproduto (20 g/L) foi adicionado de tampão Tris-HCl (100 mM; pH 8,0; 5 mM  $Ca^{2+}$ ) e, após pré-incubação (55 °C; 20 min), as reações foram iniciadas pela adição da protease bruta (5% v/v). As incubações (55 °C) ocorreram por até 6 h em banho-maria com agitação, e amostras de sacrifício foram coletadas nos tempos (t) 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 min. As hidrólises foram finalizadas por fervura (20 min) e, após centrifugação, os sobrenadantes (hidrolisados) foram avaliados quanto à concentração de proteínas solúveis e atividades antioxidantes.

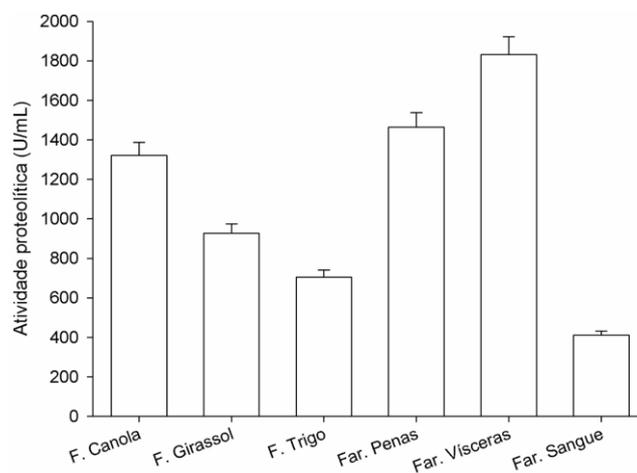
O conteúdo de proteínas solúveis foi determinado pelo método Folin-fenol. As atividades antioxidantes foram determinadas por meio (i) da captura do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS, %), (ii) da captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, %), (iii) da quelação de  $Fe^{2+}$  (%), pelo método da ferrozina; e (iv) do poder redutor [absorbância (Abs) a 700 nm], pelo método do ferricianeto de potássio.

#### 4 Resultados e Discussão

Os seis substratos avaliados sustentaram a produção de proteases por *Bacillus* sp. CL33A, embora em diferentes níveis. Produções superiores foram detectadas usando farinha de vísceras (1.831,5 U/mL) (Fig. 1), que foi então selecionada para a obtenção da protease bruta a ser usada nos processos de hidrólise enzimática.

Destaca-se que a farinha de vísceras é produzida em graxarias como insumo de baixo valor, sendo direcionada especialmente para a alimentação animal. No entanto, os resultados apresentados (Fig. 1) sugerem que o uso da farinha de vísceras em processos microbianos pode ser relevante para reduzir os custos de produção de enzimas.

**Figura 1.** Produção de protease por *Bacillus* sp. CL33A após 4 dias de cultivo submerso com diferentes substratos. Legenda: F. = farelo; Far. = farinha.



A protease bruta foi usada na hidrólise enzimática de FV e FS. Assim como a FV, a FS é gerada em graxarias e majoritariamente usada como ingrediente em rações (ABRA, 2024).

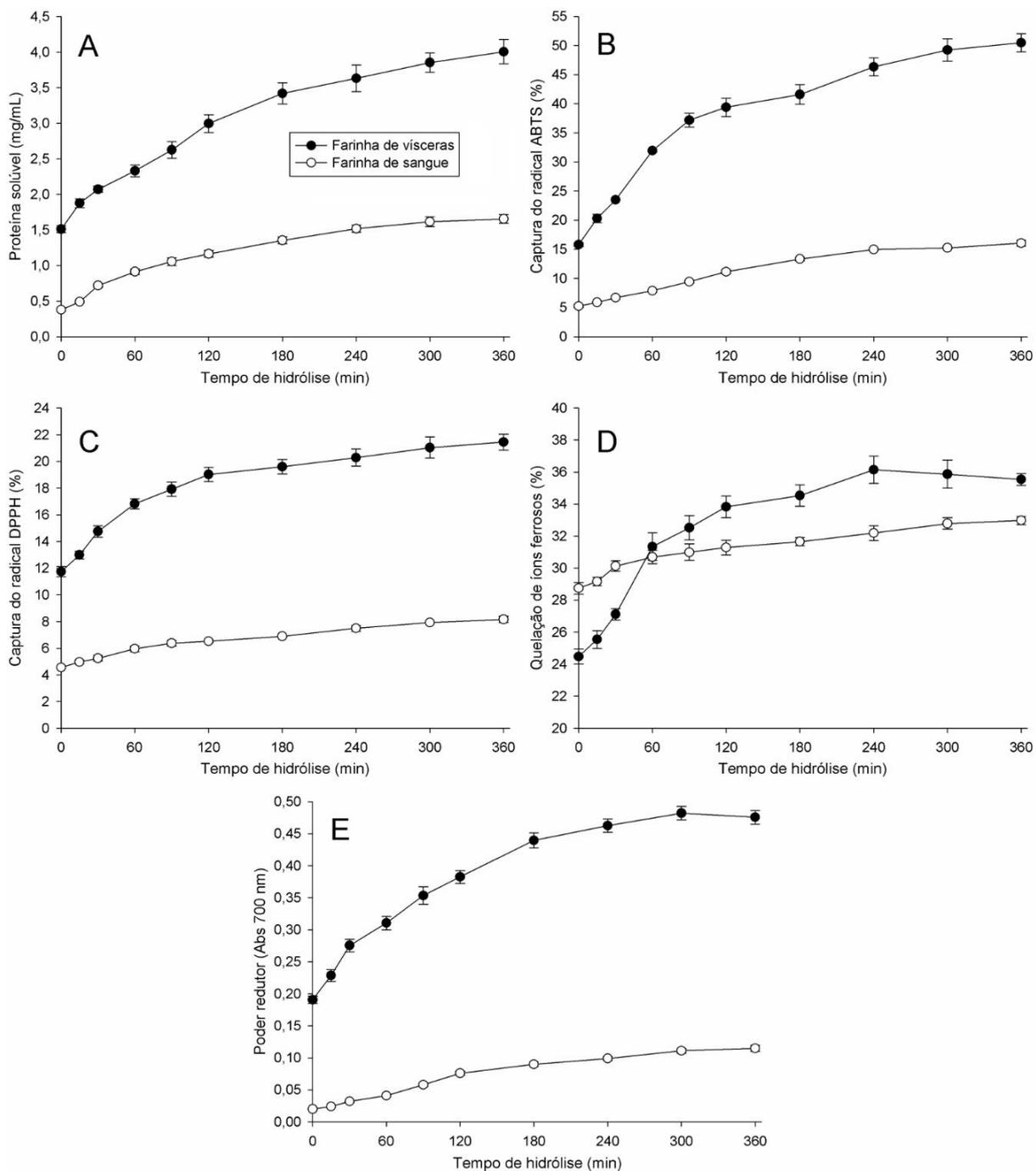
Durante as incubações com a protease bruta, a concentração de proteínas solúveis foi elevada de 1,51 mg/mL (t0) para 1,99 mg/mL (t120) e 4,01 mg/mL (t360) no caso da FV, e de 0,38 mg/mL (t0) para 1,16 mg/mL (t120) e 1,66 mg/mL (t360) no caso da FS (Fig. 2A). Assim, indica-se que a protease de *Bacillus* sp. CL33A foi capaz de hidrolisar ambos os substratos proteicos, liberando peptídeos de menor massa (Hoffmann et al., 2024).

A hidrólise foi benéfica em relação às atividades antioxidantes, que foram superiores às daquelas dos substratos não hidrolisados (t0). A captura do radical ABTS pela FV foi incrementada de 15,8% (t0) para 39,4% (t120) e 50,5% (t360); já para a FS, a captura do radical (5,2%; t0) foi elevada para 11,1% (t120) e 16,1% (t360) (Fig. 2B). Nos ensaios com o radical DPPH, a capacidade de captura da FV (11,7%; t0) foi aumentada para 16,8% (t60) e ~21,2% (t300-360), e aquela da FS (4,6%; t0) foi incrementada para 6,0% (t60) e ~8,0% (t300-360) (Fig. 2C). Logo, os resultados indicam a habilidade dos peptídeos liberados em transferir elétrons, neutralizando radicais livres (Munteanu; Apetrei, 2021).

A quelação de  $Fe^{2+}$  é importante propriedade antioxidante dos hidrolisados proteicos, visto que tal capacidade previne ou retarda a oxidação lipídica induzida por estes íons (Munteanu; Apetrei, 2021). Neste sentido, observa-se na Fig. 2D que a capacidade quelante da FV foi incrementada de 24,4% (t0) para 27,1% (t30) e 34,5-36,1% (t180-360), e que a quelação pela FS foi aumentada de 28,7% (t0) para 30,1% (t30) e 31,7-32,9% (t180-360).

**Figura 2.** Conteúdo de proteínas solúveis (A) e atividades antioxidantes (B-E) mensuradas

durante o tratamento das farinhas de vísceras (●) e sangue (○) com a protease bruta.



O poder redutor foi elevado durante a hidrólise, de 0,190 Abs700 (t0) para 0,356 Abs700 (t90) e ~0,480 Abs700 (t300-360) no caso da FV; e de 0,020 Abs700 (t0) para 0,058 Abs700 (t90) e ~0,113 Abs700 (t300-360) no caso da FS (Fig. 2E). Isto reforça a capacidade de transferência de elétrons como mecanismo antioxidante dos hidrolisados, o que contribui para reduzir intermediários do processo de peroxidação lipídica (Hoffmann et al., 2024).

Em estudos prévios, hidrolisados antioxidantes foram obtidos a partir de FV e FS usando

proteases microbianas comerciais, como Alcalase e Flavourzyme (Alves et al., 2021; Amaral; Castro, 2024). De nosso conhecimento, a produção de hidrolisados bioativos a partir de FV e FS usando uma preparação enzimática não-comercial, é reportada pela primeira vez.

## 5 Conclusão

*Bacillus* sp. CL33A produziu níveis superiores de protease em cultivos com FV. Os hidrolisados obtidos com a protease bruta exibiram atividades antioxidantes superiores às dos substratos, sendo que valores máximos foram alcançados às 4-6 h de hidrólise. A obtenção de hidrolisados antioxidantes apresenta-se pertinente para a agregação de valor à FV e FS.

## Referências Bibliográficas

- ABRA (Associação Brasileira de Reciclagem Animal). **Anuário 2023**. Brasília: ABRA, 2024.
- Alves, F. *et al.* Valorization of abundant slaughterhouse by-product as source of technofunctional and antioxidant protein hydrolysates. **Waste Biomass Valoriz**, v. 12, p. 263-279, 2021.
- Amaral, Y. M. S.; Castro, R. J. S. Unraveling the biological potential of chicken viscera proteins: a study based on their enzymatic hydrolysis to obtain hydrolysates with antioxidant properties. **Prep Biochem Biotechnol**, v. 54, p. 809–818, 2024.
- Boboua, S.Y.B. *et al.* Valorization of animal waste proteins for agricultural, food production, and medicinal applications. **Front Sustain Food Sys**, v. 8, Artigo 1366333, 2024.
- Hoffmann, R.G. *et al.* Enzymatic processing animal by-products: production of hydrolysates with *Bacillus* sp. CL18 crude protease. **Environ Sci Pollut Res**, v. 31, p. 26737–26746, 2024.
- Munteanu, I.G.; Apetrei, C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. **Int J Mol Sci**, v. 22, Artigo 3380, 2021.

**Palavras-chave:** *Bacillus*; bioconversão; protease; hidrolisados bioativos.

**Nº de Registro no sistema Prisma:** PES 2024-0051

## Financiamento



(PES 2023-0080)