



## TRIAGEM DE SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASE BACTERIANA E HIDROLISADOS ANTIOXIDANTES

**Juliano Backes Scherer**

Mestrando no Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul (PPGATS-UFFS) e bolsista DS-CAPES

**Bruna Willig Kopplin**

Mestranda no PPGATS-UFFS e bolsista DS-CAPES

**Gabriela Poll Moraes**

Mestra pelo PPGATS-UFFS (ex-bolsista DS-CAPES)

**Daniel Joner Daroit**

Professor Associado da UFFS

daniel.daroit@uffs.edu.br

### 1. Introdução

Proteases são enzimas que hidrolisam proteínas e peptídeos, encontrando aplicações em indústrias de detergentes, couros, alimentos, rações, no manejo de resíduos, entre outras. Microrganismos são as principais fontes de proteases de uso comercial. A produção destas enzimas depende, dentre outros fatores, dos substratos fornecidos aos microrganismos. Isso impulsiona pesquisas na busca por substratos baratos e facilmente disponíveis para os cultivos microbianos (Solanki et al., 2021).

Atividades agroindustriais, que processam produtos da agricultura e pecuária, geram enormes quantidades de subprodutos que requerem destinação adequada para evitar problemas ambientais e de saúde pública. Subprodutos agroindustriais podem servir como excelentes substratos para cultivos microbianos, servindo não apenas para reduzir os custos de produção das enzimas microbianas, mas também como forma de agregar valor a estas biomassas, contribuindo à sociedade na perspectiva da mitigação de impactos ambientais (Pereira et al., 2024).

Ademais, a relevância destes processos pode ser aprimorada concentrando esforços na obtenção simultânea de produtos distintos, como enzimas proteolíticas e moléculas bioativas (Lemes et al., 2022). Neste contexto, objetivou-se avaliar diversas biomassas para obtenção de proteases e hidrolisados antioxidantes durante cultivos submersos com *Bacillus* sp. CL33A.



## 2. Metodologia

Colônias do isolado bacteriano *Bacillus* sp. CL33A, obtidas após cultivos em placas de Ágar Padrão para Contagem (30 °C, 24 h), foram adicionadas a solução salina (8,5 g/L NaCl) estéril. As suspensões celulares, ajustadas para ~1,0 unidade de absorbância (Abs) a 600 nm, foram usadas como inóculo.

Vinte substratos orgânicos foram triados para a produção de proteases. Os cultivos submersos ocorreram em Erlenmeyers (250 mL) contendo 50 mL de meio mineral ( $K_2HPO_4$ , 0,3 g/L;  $KH_2PO_4$ , 0,4 g/L; NaCl, 0,5 g/L; pH 7,5) e um substrato orgânico (10 g/L). Após esterilização e resfriamento, os meios foram inoculados com 1 mL de suspensão bacteriana. A incubação ocorreu a 30 °C, 125 rpm, por 0 a 6 dias. Amostras dos cultivos (0,5 mL) foram coletadas a cada 24 h, centrifugadas ( $10.000 \times g$ , 10 min), e os sobrenadantes (protease bruta) foram usados nas avaliações subsequentes.

Para avaliação da produção de proteases, os sobrenadantes (10 µL) foram adicionados de 190 µL de tampão Tris-HCl (100 mM; pH 8,0) e 300 µL de azocaseína (10 g/L, no mesmo tampão). As misturas foram incubadas (55 °C, 15 min) e as reações finalizadas com 600 µL de ácido tricloroacético (TCA; 100 g/L). Após centrifugação ( $10.000 \times g$ , 5 min), os sobrenadantes da reação (800 µL) foram adicionados a 200 µL de NaOH (1,8 M), e aAbs determinada a 420 nm. Definiu-se uma unidade de protease (U) como a quantidade de enzima a elevar 0,1 unidade de Abs a 420 nm.

A atividade antioxidante foi avaliada pela captura do radical 2,2'-azinobis-(3-etylbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS). Soluções do radical (1 mL), diluídas em tampão fosfato salino até atingir Abs de  $0,70 \pm 0,02$  a 734 nm, foram adicionadas a 5 µL de sobrenadante dos cultivos. Mensurou-se a Abs a 734 nm após 10 min. Nos brancos, foi usada água destilada no lugar das amostras. Os resultados foram expressos como:

$$\text{Captura do radical ABTS (\%)} = [(\text{Abs}_{\text{branco}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) / \text{Abs}_{\text{branco}}] \times 100.$$

Cultivos e ensaios foram realizados em triplicatas. Os resultados das replicatas foram usados para o cálculo de médias. Comparações entre médias foram realizadas por análise de variância, seguida pelo teste de Tukey, e consideradas diferentes se  $p < 0,05$ . Para a comparação de atividades antioxidantes entre tempos de cultivo, utilizou-se o teste *t* de Student, e as médias foram consideradas distintas se  $p < 0,05$ .



### 3. Resultados e discussão

*Bacillus* sp. CL33A produziu proteases com os 20 substratos avaliados (Tabela 1). Em comparação com a peptona (controle; 686,9 U/mL), produções similares ( $p > 0,05$ ) ocorreram com bagaço de malte, escamas de tilápia, farelos de soja e de trigo. Já os farelos de girassol, de linhaça e de canola, as farinhas de penas e de vísceras, e levedura seca, sustentaram produção superior à peptona ( $p < 0,05$ ). Destaca-se a farinha de vísceras, que resultou na maior produção (1.804,7 U/mL; dia 4) e produtividade (451,2 U/mL/dia).

**Tabela 1:** Produção máxima de protease por *Bacillus* sp. CL33A durante cultivos submersos com diversos substratos (10 g/L).

Substrato	Atividade proteolítica máxima (U/mL)*	Tempo de cultivo (dias)	Produtividade (U/mL/dia)*
Peptona (controle)	686,9 <sup>f</sup>	3	229,0 <sup>h</sup>
Bagaço de malte	659,5 <sup>f</sup>	5	131,9 <sup>f</sup>
Borra de café	248,4 <sup>b</sup>	5	49,7 <sup>b</sup>
Escamas de tilápia	680,3 <sup>f</sup>	2	340,2 <sup>i</sup>
Farelo de arroz	472,8 <sup>d</sup>	4	118,2 <sup>ef</sup>
Farelo de aveia	196,8 <sup>ab</sup>	3	65,6 <sup>c</sup>
Farelo de canola	1.320,5 <sup>i</sup>	4	330,1 <sup>i</sup>
Farelo de girassol	927,6 <sup>g</sup>	4	231,9 <sup>h</sup>
Farelo de linhaça	1.519,0 <sup>j</sup>	4	379,8 <sup>j</sup>
Farelo de milho	178,7 <sup>a</sup>	5	35,7 <sup>a</sup>
Farelo de soja	667,5 <sup>f</sup>	3	222,5 <sup>h</sup>
Farelo de trigo	705,9 <sup>f</sup>	4	176,5 <sup>g</sup>
Farinha de carne e ossos	437,2 <sup>cd</sup>	5	87,4 <sup>d</sup>
Farinha de cascas de maracujá	533,9 <sup>e</sup>	5	106,8 <sup>e</sup>
Farinha de centeio	440,5 <sup>cd</sup>	4	110,1 <sup>e</sup>
Farinha de penas	1.475,8 <sup>ij</sup>	4	369,0 <sup>ij</sup>
Farinha de sangue	411,3 <sup>c</sup>	4	102,8 <sup>e</sup>
Farinha de vísceras	1.804,7 <sup>k</sup>	4	451,2 <sup>k</sup>
Levedura residual de cervejaria	270,0 <sup>b</sup>	3	90,0 <sup>d</sup>
Levedura seca inativa	1.039,8 <sup>h</sup>	3	346,6 <sup>i</sup>

\* Nas colunas, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Os sobrenadantes dos cultivos com os melhores substratos alternativos para a produção de proteases foram também avaliados quanto ao potencial antioxidante. É possível observar, a partir da Tabela 2, que as atividades antioxidantes foram superiores após os cultivos, quando comparadas ao início destes processos (Dia 0).

Pelo ensaio de atividade antioxidante que foi empregado (captura do radical ABTS), indica-se que moléculas liberadas a partir dos substratos pela atividade



microbiana apresentaram capacidade de estabilizar os radicais-teste por meio da doação de elétrons (Munteanu; Apetrei, 2021).

**Tabela 2:** Atividade antioxidante em sobrenadantes no início dos cultivos (Dia 0) e naqueles onde observou-se máxima produção de proteases (cf. Tabela 1)\*.

Substrato	Captura do radical ABTS**	
	% (Dia 0)	% (Dia)
Bagaço de malte	6,4 <sup>bc,A</sup>	10,6 <sup>a,B</sup> (Dia 5)
Escamas de tilápia	4,6 <sup>ab,A</sup>	12,4 <sup>ab,B</sup> (Dia 2)
Farelo de canola	13,7 <sup>de,A</sup>	39,1 <sup>d,B</sup> (Dia 4)
Farelo de girassol	16,8 <sup>e,A</sup>	25,7 <sup>c,B</sup> (Dia 4)
Farelo de linhaça	13,2 <sup>d,A</sup>	28,7 <sup>c,B</sup> (Dia 4)
Farelo de soja	16,0 <sup>e,A</sup>	47,4 <sup>e,B</sup> (Dia 3)
Farelo de trigo	3,9 <sup>a,A</sup>	13,7 <sup>b,B</sup> (Dia 4)
Farinha de penas	6,3 <sup>bc,A</sup>	38,5 <sup>d,B</sup> (Dia 4)
Farinha de vísceras	8,1 <sup>c,A</sup>	40,7 <sup>d,B</sup> (Dia 4)
Levedura seca inativa	5,4 <sup>b,A</sup>	42,3 <sup>de,B</sup> (Dia 3)

\* Avaliada apenas para os melhores substratos para a produção de proteases (Tabela 1).

\*\* Letras minúsculas distintas nas colunas, e letras maiúsculas distintas nas linhas, indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Os principais determinantes das bioatividades durante cultivos microbianos com substratos de origem animal são os peptídeos derivados da hidrólise dos substratos. Embora peptídeos também contribuam para as bioatividades durante cultivos com subprodutos vegetais, as atividades antioxidantes estão usualmente associadas a compostos fenólicos liberados a partir dos substratos (Martí-Quijal et al., 2021).

Os maiores incrementos na atividade antioxidante, em relação ao Dia 0, foram detectados com farelo de soja, farinhas de penas, de vísceras, e levedura seca inativa. Assim, considerando um bioprocesso para a produção de simultânea de proteases (Tabela 1) e hidrolisados antioxidantes (Tabela 2), a farinha de vísceras foi o melhor substrato.

A farinha de vísceras é tradicionalmente aplicada na nutrição animal e possui baixo custo (R\$ ~4,00/kg), sendo que ~710 mil toneladas são produzidas anualmente em indústrias de reciclagem no Brasil (ABRA, 2024). Aparentemente, apenas uma investigação prévia reportou o uso desta farinha como substrato apropriado para a obtenção conjunta de enzimas proteolíticas e peptídeos antioxidantes, que utilizou *Aspergillusoryzae* durante fermentações em estado sólido (Amaral; Castro, 2023).



#### 4. Considerações finais

Diversos subprodutos e biomassas, amplamente disponíveis no cenário brasileiro, apresentaram-se como substratos adequados para a produção de proteases microbianas e hidrolisados antioxidantes, com ênfase para a farinha de vísceras. Os produtos obtidos sugerem que os processos microbianos investigados são interessantes abordagens de biorrefinaria para a valorização de biomassas. Proteases e hidrolisados bioativos devem ser explorados quanto a potenciais aplicações.

#### Referências

- ABRA (Associação Brasileira de Reciclagem Animal). **Anuário ABRA 2023**. Brasília: ABRA, 2024.
- AMARAL, Y. M. S.; CASTRO, R. J. S. Chicken viscera meal as substrate for the simultaneous production of antioxidant compounds and proteases by *Aspergillus oryzae*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 46, p. 1777–1790, 2023.
- LEMES, A. C. *et al.* Biological approaches for extraction of bioactive compounds from agroindustrial by-products: a review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, Artigo 802543, 2022.
- MARTÍ-QUIJAL, F. J. *et al.* Obtaining antioxidants and natural preservatives from food by-products through fermentation: a review. **Fermentation**, v. 7, Artigo 106, 2021.
- MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, Artigo 3380, 2021.
- PEREIRA, A. S. *et al.* From agri-food wastes to enzyme production: a systematic review with *MethodiOrdinatio*. **Waste and Biomass Valorization**, v. 15, p. 5843-5870, 2024.
- SOLANKI, P. *et al.* Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. **3 Biotech**, v. 11, Artigo 428, 2021.

#### Agradecimentos

À UFFS, pelo auxílio financeiro (PES-2023-0080), e a CAPES, pelas bolsas DS-CAPES (J. B. Scherer; B. W. Kopplin; G. P. Moraes).