

LUANA MAFRA LIMA

PEPTIDASES DE *Bacillus* sp. PARA A PRODUÇÃO DE
HIDROLISADOS DE PROTEÍNA DE SOJA PARA A COSMÉTICA
CAPILAR



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências
Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2016

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Alane Beatriz Vermelho e coorientação de Ana Maria Mazotto de Almeida.

CIP - Catalogação na Publicação

L187p Lima, Luana Mafra
 Peptidases de *Bacillus* sp. para produção de
 hidrolisados de proteína de soja para a cosmética
 capilar / Luana Mafra Lima. -- Rio de Janeiro,
 2016.

 58 f.

 Orientadora: Alane Beatriz Vermelho.
 Coorientadora: Ana Maria Mazotto de Almeida.
 Trabalho de conclusão de curso (graduação) -

 Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
 de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
 Microbiologia e Imunologia, 2016.

 1. Peptídeo hidrolases. 2. Microrganismos. 3.
 Hidrolisados de proteína. 4. Proteínas de soja. 5.
 Cosméticos. I. Vermelho, Alane Beatriz, orient.
 II. Almeida, Ana Maria Mazotto de, coorient. III.
 Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUANA MAFRA LIMA

PEPTIDASES DE *Bacillus* sp. PARA A PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS DE
PROTEÍNA DE SOJA PARA A COSMÉTICA CAPILAR

Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2016.

(Sérgio Fracalanza, Prof. Titular, IMPG - UFRJ)

(Eliana Flávia Camporese, Prof^ª.,EQ - UFRJ)

(Verônica da Silva Cardoso, Dr^ª., IMPG - UFRJ)

(Flávia Lima do Carmo, Prof^ª. Adjunta, IMPG - UFRJ)

DEDICATÓRIA

“À minha mãe e ao Todo Poderoso, que sempre olharam por mim e me deram forças para continuar a traçar meu caminho”.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao Todo Poderoso e aos bons espíritos por acompanharem minha trajetória de vida e me guiar ao desenvolvimento pessoal e espiritual e me dar suporte para seguir em frente;

Aos meus pais pela oportunidade de chegar onde estou, me dando uma estrutura educacional e incentivo ao modo deles, seja com caronas ou companhia para dias de feriado no Fundão para terminar os experimentos;

À minha orientadora Alane Beatriz Vermelho por ter me acolhido como aluna de iniciação científica em seu laboratório por quase 2 anos;

À minha coorientadora e amiga Ana Maria Mazotto por todo ensinamento acadêmico e de vida, pelas conversas que divertiam nossas rotinas e por ser essa profissional que tomo como um exemplo a ser seguido;

Aos meus companheiros de laboratório Amanda Lopes, Athayde Junior, João Barreto, Jonas Nóbrega, Maria Cristina, Vanessa Sousa e Verônica Cardoso, por tornarem meus dias cheios de aprendizado e mais divertidos;

Às agências de fomento Capes, CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro a pesquisa;

Ao André da Secretaria de Graduação da Micro por me aturar todos esses anos pedindo para verificar o quanto faltava para eu concluir o curso;

Aos meus colegas de curso Felipe Miceli, Helver Dias e Wesley Santos por todos os conselhos sejam acadêmicos ou de vida, por toda paciência e atenção;

Às minhas divas Amanda Ambrosio, Caroline Esther, Caroline Monteiro, Celina Guedes, Gabriela Cardoso e Lethielle que tornaram esses 4 anos de faculdade suportáveis e estiveram comigo tanto nos momentos felizes quanto nos momentos tristes, me aconselhando e dando suporte para não desistir;

Aos meus amigos fora da faculdade Barbara Rodrigues, Breno Arosa, Damaris Nóbrega, Diego Santiago, Luana Alves, Luis Lemelle, Natália Castro e Paula Lima pela paciência que tiveram para escutarem durante todos esses anos sobre provas e monografia e que me aconselhavam sempre que precisava e me proporcionaram as melhores conversas.

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos”.

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

LUANA MAFRA LIMA

PEPTIDASES DE *Bacillus* sp. PARA A PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS DE PROTEÍNA DE SOJA PARA A COSMÉTICA CAPILAR

Orientador: Alane Beatriz Vermelho

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

As proteínas têm sido utilizadas em produtos cosméticos há bastante tempo, entretanto, a utilização de hidrolisados de proteínas de origem vegetal é relativamente recente. Os hidrolisados podem ser obtidos via hidrólise química, onde há perda total ou parcial de alguns aminoácidos, ou hidrólise enzimática, que ocorre em condições mais amenas, e vem substituindo a hidrólise química. Enzimas microbianas comerciais vêm ganhando espaço, entretanto há poucos esforços na utilização de processos fermentativos na obtenção de hidrolisados para cosméticos. Considerando a aplicabilidade dos hidrolisados de soja em cosméticos e o uso potencial de processos fermentativos para obtê-los, o objetivo deste trabalho foi selecionar uma cepa de *Bacillus* proteolítico produtora de hidrolisados de soja por fermentação. Assim, foram selecionadas 10 amostras da coleção de cultura de microrganismos do laboratório Bioinovar quanto seu perfil proteolítico em meio ágar caseína. As amostras eram provenientes de lã de ovelha e resíduos de penas, sendo identificadas como do gênero *Bacillus* (B2, AMR, PP3, EL06, EL05 e EL07) ou sem a identificação confirmada (B3, Lã P8, Bac.B2 e C2). As amostras foram analisadas, através de dosagens e zimografias, quanto à produção de peptidases extracelulares e peptídeos, obtidos da hidrólise de proteína de soja por fermentação. Para a produção de hidrolisados, as amostras foram cultivadas em meio contendo proteína de soja por 5 dias. A concentração de peptídeos no sobrenadante foi mensurada, sendo as amostras EL07, AMR e PP3, apresentando as maiores concentrações de 4,84, 4,08 e 3,75 mg/mL, respectivamente. O meio não inoculado apresentou alta concentração de proteínas (da soja) de alta massa molecular, e após a fermentação com as amostras selecionadas, a quantidade de proteínas com uma massa superior a 20 kDa (limite de detecção do ensaio) reduziu drasticamente, indicando sua hidrólise. Os hidrolisados EL07, AMR e PP3 foram submetidos ao MALDI-TOF, sendo detectáveis peptídeos de baixa massa molecular (até 2 kDa). Todas as amostras foram avaliadas quanto à presença e quantidade de aminoácidos, sendo o ácido glutâmico encontrado em quase todas as amostras incluindo o controle negativo. As amostras AMR e EL07 apresentaram maiores quantidades de aminoácidos diferentes detectáveis por TLC. E, todas apresentaram alta concentração de aminoácidos totais nos hidrolisados gerados, destacando-se a amostra EL07 com concentração de 3,47 mg/mL. Em relação à presença de peptidases, as amostras EL06, EL07, C2 e PP3 obtiveram os melhores resultados. No zimograma, as amostras B2, EL06, PP3 e AMR apresentaram um perfil de múltiplas bandas, na faixa de 20 a 94 kDa, assim como as amostras B3 e EL05, que apresentaram uma banda com aproximadamente 7kDa. As amostras Bac.B2, EL07 e C2 apresentaram bandas com massa molecular superior à 100 kDa, tendo a amostra C2 uma peptidase de alta massa, superior à 200 kDa. A amostra LãP8 não apresentou bandas detectáveis nas condições do ensaio. Assim, conclui-se que os hidrolisados produzidos pelas cepas AMR, EL07 e PP3 apresentaram

potencial para aplicação em cosméticos para cuidados capilares, sendo a cepa EL07 selecionada para experimentos posteriores.

Palavras-chave: peptídeo hidrolases, microrganismos, hidrolisados de proteína, proteínas de soja, cosméticos

ABSTRACT**LUANA MAFRA LIMA****PEPTIDASES FROM *Bacillus* sp. FOR THE PRODUCTION OF SOY PROTEIN
HYDROLYSATES FOR THE CAPILLAR COSMETIC****Orientador: Alane Beatriz Vermelho****Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Proteins have been used in cosmetic products for a long time, however, the use of vegetable protein hydrolysates is recent. Hydrolysates can be obtained by chemical hydrolysis, where there is total or partial loss of some amino acids or enzymatic hydrolysis, occurring under milder conditions and is replacing a chemical hydrolysis. Commercial microbial enzymes have been conquering space, however, there are few efforts in the use of fermentative processes in obtaining hydrolysates for cosmetics. Considering the applicability of soy hydrolysates to cosmetics and the potential use of fermentation processes to obtain them, the objectives of this work are selected a proteolytic *Bacillus* strain to hydrolyze soy bean by fermentation. Thus, ten samples were selected from the collection of microorganisms of the Bioinovar laboratory, according their proteolytic profile in casein agar medium. The samples were obtained from sheep wool and feather residues and were identified as *Bacillus* (B2, AMR, PP3, EL06, EL05 and EL07) or without confirmed identification (B3, Lã P8, Bac.B2 and C2). The samples were analyzed by means of dosages and zymographs for the production of extracellular peptidases and peptides obtained from the hydrolysis of soy protein by fermentation. For the production of hydrolysates, the samples were cultured in medium containing soy protein for 5 days. The concentration of peptides in the supernatant was measured, being EL07, AMR and PP3, with the highest concentrations of 4.84, 4.08 and 3.75 mg / mL, respectively. The uninoculated medium had a high concentration of high molecular weight (soybean) proteins and after fermentation with the selected samples, the amount of proteins with a mass larger than 20 kDa (detection limit of the assay) reduced drastically, indicating its hydrolysis. The EL07, AMR and PP3 hydrolysates were submitted to MALDI-TOF and low molecular mass peptides (up to 2 kDa) were detectable. All samples were evaluated for the presence and amount of amino acids, with glutamic acid being found in almost all samples including the negative control. AMR and EL07 samples showed higher amounts of different amino acids detectable by TLC. And, all samples had a high concentration of total amino acids in the hydrolysates generated, highlighting the EL07 sample with concentration of 3.47 mg/mL. About the presence of peptidases, EL06, EL07, C2 and PP3 samples obtained the best results. In the zymogram, the B2, EL06, PP3 and AMR samples presented a profile of multiple bands in the range of 20 to 94 kDa, as well as B3 and EL05 samples, which presented a band with approximately 7 kDa. The Bac.B2, EL07 and C2 samples presented bands with molecular mass superior to 100 kDa. The C2 sample got high mass peptidase, superior to 200 kDa. The LãP8 sample had no detectable bands at the assay conditions. Thereby, it was concluded that the hydrolysates produced by the AMR, EL07 and PP3 strains had potential for application in cosmetics for hair care. The sample EL07 was selected for posterior experiments.

Keywords: peptide hydrolases, microorganisms, protein hydrolysates, soy proteins, cosmetics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mercado mundial de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, conforme dados do Euromonitor de 2016	2
Figura 2. Empresas distribuídas por região/estado, conforme panorama da ABIHPEC 2016	3
Figura 3. <i>Glycine max</i> (Merrill) L. ou soja, também conhecida como feijão-soja e feijão-chinês, a esquerda. Proteína isolada de grãos de soja, a direita	7
Figura 4. A aplicação das enzimas industriais no mercado	10
Figura 5. Classificação das enzimas de acordo com a IUBMB	11
Figura 6. Classificação das peptidases quanto ao local de clivagem na proteína	12
Figura 7. Visão geral da aplicação das peptidases	14
Figura 8. Medidas de zona de hidrólise em meio sólido contendo caseína como substrato	25
Figura 9. Concentração de proteínas totais do sobrenadante do cultivo de diferentes cepas bacterianas em meio soja	26
Figura 10. Gel de SDS-PAGE do sobrenadante de cultura das cepas proteolíticas testadas cultivadas em meio soja	27
Figura 11. Análise por MALDI-TOF dos peptídeos contidos no meio proteína de soja 1% sem inóculo: Controle negativo	28
Figura 12. Análise por MALDI-TOF dos peptídeos gerados por fermentação submersa de proteína de soja na presença de <i>Bacillus subtilis</i> AMR	28
Figura 13. Análise por MALDI-TOF dos peptídeos gerados por fermentação submersa de proteína de soja na presença de <i>Bacillus sp.</i> EL07	29
Figura 14. Análise por MALDI-TOF dos peptídeos gerados por fermentação submersa de proteína de soja na presença de <i>Bacillus sp.</i> PP3.....	29
Figura 15. Concentração de aminoácidos totais obtidos por fermentação submersa de proteína de soja	31
Figura 16. Atividade proteolítica do sobrenadante de culturas das amostras testadas quando cultivadas na presença de proteína de soja como principal substrato	32
Figura 17. Zimograma com substrato gelatina das peptidases produzidas na presença de soja como substrato	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição de proteínas hidrolisadas obtidas a partir de vegetais	4
Tabela 2. Microrganismos produtores de enzimas aplicáveis à indústria	15
Tabela 3. Microrganismos da coleção de cultura do laboratório Bioinnovar utilizados na seleção de produtores de peptidases	20
Tabela 4. Meio caseína 1%	21
Tabela 5. Análise dos aminoácidos contidos nos hidrolisados de proteína de soja	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HPPC	Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
ABIHPEC	Associação Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
ABDI	Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
E.C.	Classe enzimática
NC-IUBMB	<i>Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro (<i>Generally Recognized As Safe</i>)
FS	Fermentação submersa
FES	Fermentação em estado sólido
Ageitec	Agência Embrapa de Informações Tecnológicas
BSA	Soro albumina bovina
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamina contendo SDS
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TLC	Cromatografia em camada fina
MALDI-TOF	Análise por espectrometria de massa
Da	Dalton
kDa	KiloDalton

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Mercado cosmético	1
1.2 Peptídeos usados em formulações cosméticas	3
1.3 Aplicações de hidrolisados de proteína de soja	6
1.4 Enzimas Industriais	9
1.4.1 Peptidases	11
1.5 Microrganismos aplicados à indústria	15
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVO	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Microrganismos	20
4.2 Seleção de microrganismos produtores de peptidases	21
4.3 Hidrólise microbiana de proteína de soja	21
4.4 Dosagem da concentração de proteína	22
4.5 SDS-PAGE	22
4.6 Análise em MALDI-TOF.....	22
4.7 Cromatografia em camada fina.....	22
4.8 Dosagem de Ninidrina	23
4.9 Ensaio de atividade proteolítica.....	23
4.10 Zimografia com substrato gelatina.....	23
5. RESULTADOS	25
5.1 Seleção de microrganismos proteolíticos	25
5.2 Quantificação dos peptídeos produzidos por fermentação submersa de proteínas de soja com cepas selecionadas	25
5.3 Avaliação dos peptídeos gerados por SDS-PAGE	26
5.4 Avaliação dos peptídeos gerados por espectrometria de massa	27
5.5 Determinação dos aminoácidos presentes nos hidrolisados por Cromatografia em camada fina (TLC)	30
5.6 Quantificação dos aminoácidos totais produzidos por fermentação submersa de proteínas de soja	31
5.7 Produção de peptidases na presença de proteína de soja	32
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mercado Cosmético

O Brasil atualmente ocupa a quarta posição de maior mercado de cosméticos do mundo, segundo dados do Euromonitor de 2016, representando 7,1 % do consumo mundial (Figura 1). Dentro desse mercado, o Brasil ocupa o terceiro lugar de maior consumidor mundial no segmento de produtos para cabelo (Figura 1). O setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC) é um dos setores de maior destaque na economia brasileira. Em 2014 o setor cresceu 11%, com faturamento de R\$ 101,7 bilhões, segundo dados da Associação Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), contribuindo com 1,8% do PIB nacional. Pela importância do setor no Brasil, o Sebrae, a ABDI (Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial) e a ABIHPEC criaram um Portal de Inovação em HPPC (<http://www.portalinovacaohppc.com/Web/Institucional/Portal>). Este portal objetiva estimular as empresas atuantes no setor através de informações estratégicas sobre tendências e tecnologias. Além disso, o portal disponibiliza informações sobre laboratórios, pesquisadores e prestadores de serviços tecnológicos em HPPC, incentivando a inovação no setor.

Muitos fatores contribuíram para o crescimento vasto do setor, nos quais podemos destacar: o acesso por todas as classes econômicas, incluindo as classes mais baixas (D e E) aos produtos do setor; novos indivíduos na classe C (classe média) começaram a consumir produtos relativamente mais caros, ou seja, com maior valor agregado; a crescente participação da mulher brasileira no mercado de trabalho, elevando assim o consumo, afinal, são as maiores consumidoras de cosméticos no mundo. Outros fatores como a utilização de uma alta tecnologia e o consequente aumento da produtividade, lançamentos constantes de produtos atendendo cada vez mais às necessidades do mercado e aumento da expectativa de vida, levando a uma necessidade de conservar uma beleza jovial, são cruciais para o constante crescimento desse setor, segundo dados da ABIHPEC (2016).

As definições de cosméticos, produtos de higiene pessoal e perfumes foram estabelecidas pela Lei Federal nº 6.360/76 onde o Art.º3 Inciso V define cosméticos como produtos para uso externo, destinados à proteção ou ao embelezamento das diferentes partes do corpo, tais como pós faciais, talcos, cremes de beleza, creme para as mãos e similares, máscaras faciais, loções de beleza, soluções leitosas, cremosas e adstringentes, loções para as mãos, bases de maquiagem e óleos cosméticos, rugas blushes, batons, lápis labiais, preparados antissolares, bronzadores e simulatórios, rímeis, sombras, delineadores, tinturas capilares, agentes

clareadores de cabelos, preparados para ondular e para alisar cabelos, fixadores de cabelos, laquês, brilhantinas e similares, loções capilares, depilatórios e epilatórios, preparados para unhas e outros.

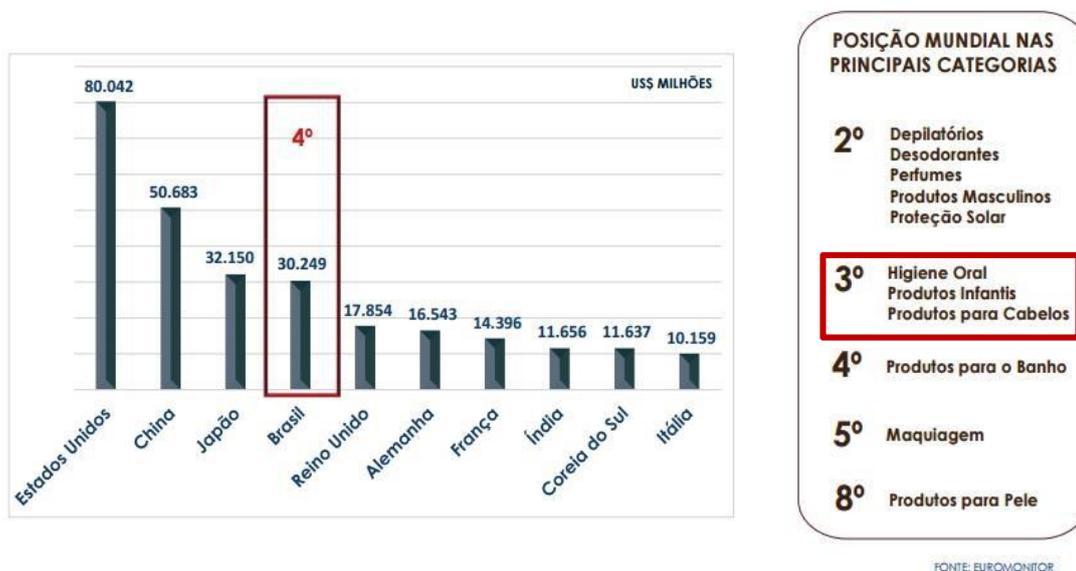


Figura 1. Mercado mundial de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (Fonte: Euromonitor International, 2016).

O potencial do mercado de beleza do Brasil vem chamando a atenção de várias empresas multinacionais, como a Unilever, Procter & Gamble, L'Óreal, e marcas de luxo como L'Occitane. Existem 2613 empresas atuando no mercado de produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, sendo que as 20 maiores empresas, regularizadas pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), representam 75% do faturamento total, conforme dados fornecidos pela ABIHPEC 2016. A figura 2, mostra onde estas empresas estão localizadas, cerca de 40% delas encontram-se no estado de São Paulo. Dentre as empresas nacionais, destaca-se a Natura, que tem uma participação de 13,4% no mercado brasileiro de cosméticos e é a 20ª marca mais valiosa de cosméticos do mundo.

Sendo um setor altamente valorizado e competitivo, o mercado cosmético visa sempre inovação em seus produtos, buscando sempre alta produtividade. Produtos à base de matérias-primas vegetais, como exemplo, hidrolisados de proteínas de origem vegetal tem uma demanda constante no setor. Estes hidrolisados apresentam maior apelo comercial uma vez que alcançam consumidores preocupados com causas ambientais, levando a uma abrangência no consumo e uma obtenção de maiores lucros. Além disso, o aumento da demanda pelos chamados "cosméticos verdes" decorre da percepção de que eles proporcionam uma melhoria na saúde e bem-estar.



Figura 2. Empresas distribuídas por região/estado, conforme panorama da ABIHPEC 2016.

1.2. Peptídeos usados em formulações cosméticas

A indústria cosmética tem experimentado um grande desenvolvimento nos últimos anos. Por esta razão, a melhoria de produtos cosméticos tem sido uma das principais preocupações da indústria brasileira. Nesse cenário, princípios ativos, como as proteínas, têm sido amplamente estudados a fim de proporcionar uma melhora nas propriedades físico-químicas para os produtos cosméticos finais (Simionato, Carrilho e Tavares, 2011) visando sempre selecionar as fontes desses princípios ativos para a produção de cosméticos através da disponibilidade, do custo de produção e do valor no mercado da matéria-prima (Ścibisz, Arct e Pytkowska, 2008). As proteínas compõem um dos principais grupos de princípios ativos aplicados a produtos voltados para o cuidado de pele e cabelo. São aplicados em procedimentos como coloração, alisamento e outros tratamentos químicos que causam muitos danos aos fios, e em produtos para reconstrução capilar. Atualmente, a indústria cosmética utiliza alguns hidrolisados proteicos em produtos como xampus e condicionadores que ajudam na reposição da fibra capilar (Sajna *et al.*, 2015). Entretanto, a utilização de hidrolisados de proteínas de

origem vegetal é relativamente recente. O interesse em hidrolisados de proteínas vegetais é relacionado, além do apelo comercial, ao seu teor de aminoácidos característico, diferenciando do teor proveniente de proteínas de origem animal. Variadas fontes de proteínas são encontradas na natureza, tanto animal quanto vegetal tal como a queratina, gelatina, colágeno, soja, seda, leite de arroz, entre outras. A Tabela 1 mostra a quantidade de aminoácidos contidos em hidrolisados de proteínas de origem vegetal com aplicações no mercado cosmético (Ścibisz, Arct e Pytkowska, 2008).

Tabela 1. Composição de aminoácidos em proteínas hidrolisadas obtidas a partir de vegetais e soro do leite.

Aminoácidos	Quantidade de aminoácidos em proteínas hidrolisadas (mg/g)				
	Soja*	Ervilha*	Milho*	Batata*	Soro do leite*
Alanina	0,74	3,68	2,32	2,22	54,7
Arginina	1,46	7,24	2,92	1,80	28,3
Asparagina	2,28	9,76	3,25	6,01	93,4
Cisteína	0,26	0,74	1,08	0,30	42,2
Glutamina	4,16	16,40	33,20	5,67	169,4
Glicina	5,04	3,56	6,14	3,65	19,9
Histidina	0,54	2,19	1,55	<0,70	16,7
Isoleucina	0,80	3,77	2,71	2,08	49,1
Leucina	1,26	6,96	5,85	4,16	106,5
Lisina	0,54	6,24	1,62	2,47	91,9
Metionina	0,26	0,81	1,15	0,74	42,2
Fenilalanina	0,78	4,23	4,51	1,94	60,6
Prolina	1,12	4,06	12,00	2,38	74,8
Hidroxiprolina	-	-	-	-	-
Serina	1,12	3,03	4,64	1,91	55,6
Treonina	0,74	2,42	0,74	2,02	71,8
Triptofano	0,24	0,42	0,09	<0,10	17,1
Tirosina	0,24	2,72	0,51	<0,10	60,6
Valina	0,84	4,05	3,08	2,67	47,8

*Sindayikengera e Xia, 2006; Ścibisz, Arct e Pytkowska, 2008

Nos vegetais, a maior parte de suas proteínas está armazenada em sementes, onde atuam na nutrição destas, sendo esse o principal motivo pelo qual, durante a produção dos cosméticos, utilizam-se matérias-primas tais como glúten a partir de sementes de trigo, contendo 60-80% de teor de proteínas e proteínas isoladas dos grãos de soja e arroz, contendo um teor de 90% (Ścibisz, Arct e Pytkowska, 2008).

Em seu estado bruto, as proteínas não podem ser utilizadas nas formulações cosméticas diretamente, afinal, a viscosidade da solução é diretamente proporcional à massa molecular do polímero, ou seja, quanto maior o polímero mais difícil será sua incorporação no produto e, menos será absorvido pela fibra capilar. O inverso também é válido, pois, quanto menor o peptídeo, melhor sua incorporação a fibra capilar. Logo, as proteínas são submetidas a procedimentos de hidrólise para que possa se obter peptídeos a partir das proteínas. Cada hidrolisado de proteína irá conferir diferentes propriedades funcionais para os produtos cosméticos, tais como retenção de umidade e brilho, formação de película que reveste os fios capilares, substantividade, penetração, dentre outros. No entanto, estas propriedades variam de acordo com a massa molecular e a sequência de aminoácidos que constituem os peptídeos obtidos. Por este motivo, estes parâmetros devem ser cuidadosamente controlados durante um procedimento de hidrólise, logo, analisar os hidrolisados de proteína é uma tarefa importante na caracterização e no controle da qualidade das matérias-primas empregadas aos produtos cosméticos (Simionato, Carrilho e Tavares, 2011).

São relatados diferentes métodos de hidrólise na literatura, onde os hidrolisados podem ser obtidos via hidrólise química, ácida ou alcalina, ou enzimática. As reações através de hidrólise química tendem a ser difícil de controlar, levando a modificação ou a perda total ou parcial de alguns aminoácidos como triptofano, tirosina, serina e treonina. Por exemplo, em condições de hidrólise ácida convencional para obtenção de aminoácidos, utiliza HCl 6 M a 110 °C por mais de 24 h, podendo assim, destruir o triptofano. Já em casos de hidrólise alcalina, pode reduzir quimicamente a cistina, arginina, treonina, serina, isoleucina e modificar o conteúdo da lisina, podendo formar resíduos de aminoácidos anormais, tais como lisinoalanina ou lantionina. Por este motivo, a hidrólise enzimática, que é conduzida em condições mais amenas, é uma alternativa à hidrólise química (Villa *et al.*, 2013; Tavano, 2013). A produção de hidrolisados proteicos enzimáticos, usando como substrato proteínas vegetais, será um dos objetivos do projeto. A hidrólise enzimática tornou-se um meio biotecnológico para obter proteínas vegetais com propriedades funcionais melhoradas e hidrolisados de proteínas comerciais (Ahmadifard *et al.*, 2015). Os hidrolisados proteicos utilizados atualmente em processos industriais são obtidos através de hidrólise química ou enzimática, como por

exemplo, o Hydrosoy™ 2000 (Croda), Dynachondrine™ ISR biofuncional (Ashland Specialty Chemical) e Gluadin Soy (BASF). Outro exemplo, é a companhia Ajinomoto Inc. que visa a obtenção de aminoácidos através da fermentação de proteínas de origem vegetal e com aplicabilidades variadas na indústria, tendo o produto a base de aminoácido AMISAFE® AL-01 para cuidados capilares, por exemplo (Oshimura, 2013).

Um exemplo de hidrolisados são os de queratina usados tradicionalmente em produtos para reparo de dano capilar. A queratina é uma proteína de origem animal, presentes nos tecidos epidérmico e seus anexos, como cascos, pelos, chifres e penas. Um processo enzimático para produção de hidrolisados de queratina de penas de frango foi descrito como potencial aplicação comercial (família de patentes: WO2009000057 (A2); US2010196302 (A1); EP2170096 (A2)). Os hidrolisados proteicos têm grande aplicação, também, na indústria de alimentos, incluindo as rações animais (Mazotto, 2008).

Os custos na utilização de enzimas quando comparados com o uso de ácidos ou bases para hidrólise são maiores. Entretanto a especificidade das enzimas permite a obtenção de proteínas hidrolisadas com peso molecular preciso, o que é impossível de ser obtido por hidrólise química. Ścibisz, Arct e Pytkowska (2008) apresentaram estudos comparativos com hidrolisados disponíveis no mercado. Estes estudos mostraram que a massa molecular dos peptídeos obtidos por hidrólise enzimática varia entre 500 a 10.000 Da, enquanto os produtos da hidrólise química apresentaram massa molecular na faixa de 500-30.000 Da. As propriedades sensoriais (cor, odor) dos produtos de hidrólise enzimática foram definitivamente melhores em comparação com os obtidos por meio de produtos químicos.

1.3 Aplicações de hidrolisados de proteína de soja

A soja (*Glycine max* (Merrill) L.; Figura 3) é utilizada milenarmente como fonte nutricional na Ásia oriental (Fukushima e Hashimoto, 1980^{apud}.Rosa *et al.*, 2009). Foi introduzida e cultivada no Brasil no fim do século XIX (Brandão, Rezende e Marques, 2006). É uma fonte abundante e de baixo custo de proteínas que são amplamente reconhecidas por seu alto valor nutricional e ótimas propriedades funcionais. A literatura recente, têm tratado algumas funções fisiológicas de hidrolisados de proteína de soja, como por exemplo, a prevenção do câncer (Aguirre, Garro e de Giori, 2008; Lee *et al.*, 2016).



Figura 3. *Glycine max* (Merrill) L. ou soja, também conhecida como feijão-soja e feijão-chinês, a esquerda. Proteína isolada de grãos de soja, a direita. (Imagens retiradas dos respectivos sites: <http://tmffertilizantes.com.br/> e <http://glicose.com.br/>)

A proteína de soja consiste na maioria dos aminoácidos essenciais e não essenciais comohistidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), valina (Val), triptofano (Trp), alanina (Ala), arginina (Arg), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys), ácido glutâmico (Glu), glicina (Gly), prolina (Pro), serina (Ser) e tirosina (Tyr). Sendo o ácido glutâmico o aminoácido mais encontrado em seus hidrolisados (20%) enquanto a cistina é encontrada em menores concentrações (1,5%) (Simas, 2005).

Os hidrolisados de proteína de soja alimentar têm uma vasta aplicação industrial. Podem ser utilizados desde ingredientes no setor alimentício até sua aplicação em produtos para cuidados de saúde e cosméticos. Uma série de propriedades funcionais está relacionada a estes hidrolisados, os tornando assim, uma fonte de proteínas atraente (Coscueta *et al.*, 2016). Em cosméticos, os hidrolisados de proteína de soja como ingredientes são os mais utilizados em produtos para tratamento para cabelos tingidos, em tinturas e produtos para cuidados com a pele (Belsito *et al.*, 2015). A utilização de hidrolisados de proteína de soja em composições para cuidados pessoais é bem conhecida devido a sua capacidade de formar uma película protetora. Na maioria destas composições, as proteínas de soja são utilizadas numa forma hidrolisada, pois a soja não hidrolisada apresenta peptídeos com baixa solubilidade (Patente US20050008604 (A1)).

A demanda por novas fontes de proteínas deriva de crescentes custos e uma limitação na fonte proteica de origem animal. Adicionalmente, as proteínas de origem animal devem passar por testes toxicológicos antes de sua utilização, enquanto a proteína de soja, que vem sendo usada na alimentação por um longo tempo, é considerada segura (Belsito *et al.*, 2015). Logo, a soja está se tornando uma das fontes proteicas alternativas mais importantes para consumo, devido ao seu baixo custo e abundância. O grão de soja é uma matéria-prima bastante

aproveitada, pois utiliza-se desde seu óleo extraído à produtos a granel como, farinha, farelo ou proteína de soja, sendo estes ricos em proteínas e fibras (Coscueta *et al.*, 2016).

Seus coprodutos, como farinha, farelo e proteína isolada, são diferenciados de acordo com sua concentração de lipídeos, fibras, proteínas e afins. Porém, a composição da soja pode variar dependendo das condições climáticas, o tipo do solo, a localização geográfica, a variedade de práticas agrônômicas, entre outras condições em que foram cultivados seus grãos. A proteína de soja é o coproduto com maior teor proteico quando comparado aos demais, pois, seu minucioso processamento visa apenas obter o máximo de proteínas extraídas da soja, com valores de lipídeos e fibras basicamente nulos. No entanto, o farelo de soja é o coproduto mais valorizado, afinal, além de possuir um alto teor de proteínas, seu custo é bastante acessível. A extração de proteínas seguida por hidrólise controlada desse coproduto gera ingredientes funcionais com alto valor agregado, devido ao fato dos hidrolisados obtidos apresentarem algumas propriedades bioativas como antioxidantes (Horan, 1974; Coscueta *et al.*, 2016).

A proteína de soja e seus peptídeos derivados, obtidos por extração a partir de soja parcialmente hidrolisada são usados como agentes de condicionamento de cabelo e pele. Através da remoção de óleo a temperaturas mais baixas, a proteína isolada de soja é obtida, sendo esta amplamente utilizada na indústria de alimentos. A proteína isolada de soja é uma mistura de várias proteínas que são classificadas em quatro categorias de proteína de acordo com os seus coeficientes de sedimentação 2S, 7S, 11S e 15S. Entre estas proteínas, 7S (β -conglucina) e 11S (glicina) representam 80% a 90% de todas as proteínas de soja, e a razão entre 7S e 11S depende do tipo de soja. A proteína 7S consiste em três subunidades α (67 kDa), α' (71 kDa) e β (50 kDa). A proteína 11S também é polimérica, sendo composta por seis subunidades, sendo elas subunidades ácidas A (~35 kDa) e subunidades básicas B (~20 kDa), ligadas por uma ponte dissulfeto (Belsito *et al.*, 2015).

Em suma, aplicação de hidrolisados de proteínas de soja tem ganhado espaço nas indústrias pela sua abundância e baixo custo quando relacionado a outros produtos. Sua aplicação em cosméticos é crescente devido à alta vantagem em relação a obtenção de antioxidantes e seu alto teor de aminoácidos essenciais para os cuidados capilares, como ácido glutâmico, arginina e glicina, que também estão presentes na composição da proteína queratina encontrada na fibra capilar (Woodruff, 2002 *apud*. Villa, 2008; Velasco *et al.*, 2009).

1.4 Enzimas Industriais

A biotecnologia aplicada a processos industriais utilizando células de organismos vivos e biocatalisadores para sintetizar materiais ao invés de empregar compostos provenientes da indústria petroquímica ou reagentes cáusticos, chama-se “biotecnologia branca”. Tal biotecnologia continua a ser um desafio para o processamento industrial, afinal, os novos processos biocatalíticos acabam competindo economicamente com os processos químicos que são bem estabelecidos e foram otimizados por anos (Pera *et al.*, 2015; Heux *et al.*, 2015).

A maioria dos processos comerciais são realizados em altas temperaturas, pressões, acidez ou alcalinidade, sendo assim agressivos e, exigem investimentos pesados para a concepção de equipamentos específicos resistentes as condições extremas acarretando em elevados gastos de energia e uma alta demanda no consumo de água. Parte destes processos geram subprodutos indesejáveis, que são difíceis de separar e exercem impacto negativo no meio ambiente. Para combater as desvantagens acima referidas, as enzimas têm emergido como uma ferramenta poderosa (Grunwald, 2015; Heux *et al.*, 2015; Singhanian *et al.*, 2015).

A aplicação de enzimas em processos químicos economiza grande quantidade de água; por exemplo, na indústria têxtil, cerca de 70.000-90.000 litros de água é aplicada para uma tonelada de malhas. Levando em consideração que cerca de 9 milhões de toneladas de malhas são produzidas anualmente em todo o mundo, cerca de 630 bilhões de litros de água poderiam ser poupados quando utilizadas as enzimas nesses processos. Muitos compostos químicos aplicados em processos industriais podem ser facilmente substituídos pelas enzimas que cooperam para conservação do meio ambiente. Por exemplo, as enzimas podem reduzir a aplicação de sulfetos nos curtumes – onde há o processamento de couro cru –, e são graves fontes de poluição. A aplicação de ácidos e álcalis na indústria de processamento de amido e na indústria têxtil para desengomagem das fibras do tecido podem ser substituídos por enzimas, como as amilases. A utilização de enzimas em indústrias é enormemente diversificada (Figura 4), tendo assim muito mais exemplos de substituição aos produtos químicos, como a utilização de púmice ou pedra-pome, que são formadas por gás, na lavagem de jeans sendo facilmente substituída por celulases. Logo, pode-se afirmar que as enzimas contribuem para condições de trabalho mais seguras através da eliminação de tratamentos químicos durante vários processos (Singhanian *et al.*, 2015).

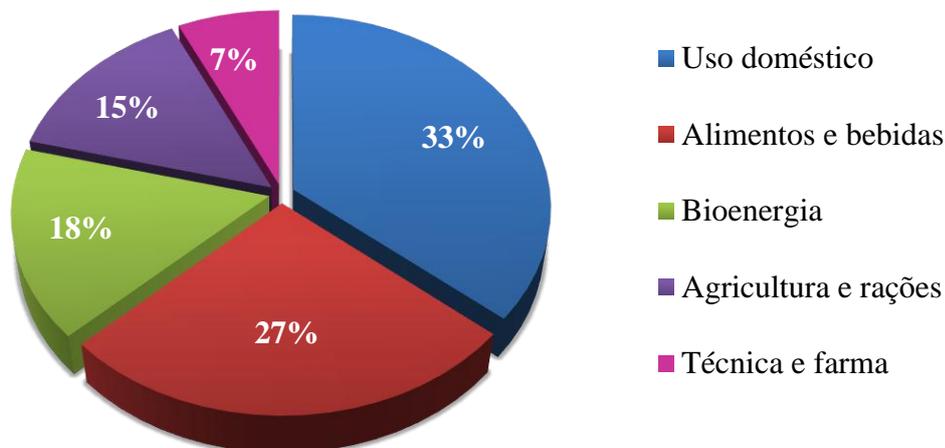


Figura 4. A aplicação das enzimas industriais no mercado (<http://report2015.novozymes.com/>)

Enzimas são denominadas catalisadores biológicos ou biocatalisadores e estes, são atraentes para fins industriais, não só porque eles são altamente específicos e eficientes quanto à bioconversão do substrato no produto de interesse, mas também porque eles são capazes de catalisar a produção em condições mais amenas e resultando em produtos relativamente puros, que levam na minimização da produção de resíduos. No entanto, nem todos os catalisadores biológicos possuem utilidades no setor industrial (Pera *et al.*, 2015; Singhanian *et al.*, 2015)

De acordo com os dados da *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB), as enzimas são classificadas em seis grandes classes, de acordo com o tipo de reação que catalisam e cada uma recebe um determinado número de classificação composto por quatro dígitos e precedido por “E.C.” (*Enzyme Commission of the IUBMB*). O primeiro dígito está relacionado com a classe, por exemplo, o número 3 representa a classe das hidrolases que catalisa reações de hidrólise associada a ligações covalentes. O segundo dígito está associado à subclasse, como exemplo, temos a peptidase que é representada pelo número 4 de acordo com IUBMB. O terceiro dígito está relacionado aos grupos químicos específicos que participam da reação, por exemplo, temos o número 21 representando o grupo de serino-endopeptidases que são caracterizadas por conterem serina no sítio ativo. E, o quarto e último dígito, representa a própria enzima, temos como exemplo, a quimotripsina representada pelo número 1, como observado na figura 5.

E.C. 3.4.21.1

3 – Hidrolase
4 – Peptidase
21 – Serinopeptidase
1 – Quimiotripsina

Figura 5. Classificação das enzimas pela IUBMB.

A principal classe de enzimas estudada para fins industriais é a classe das hidrolases. E, dentro dessa classe encontramos enzimas como amilases, celulasas, lipases, esterases, mananases, pectinases, fitases, peptidases, pululanases e xilanases (Singhania *et al.*, 2015).

1.4.1 Peptidases

Peptidases são enzimas que catalisam a hidrólise de proteínas a peptídeos menores e aminoácidos. Peptidase é o termo recomendado na nomenclatura de enzimas pelo *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB) e pelo *Human Gene Nomenclature Committee*, bem como o banco de dados de peptidases denominado MEROPS para qualquer proteína que provoca a hidrólise de ligações peptídicas. Essas enzimas também são conhecidas como proteases, proteinases e enzimas proteolíticas (Rawlings, Morton e Barret, 2007).

As peptidases possuem presença universal nos seres vivos, representando 2% do total de proteínas presentes em todos os organismos, participando de vias metabólicas e de vias de sinalização celular. Muitos microrganismos secretam peptidases para o meio externo com a finalidade de degradar proteínas cujos produtos finais de hidrólise seriam fontes de carbono e nitrogênio para multiplicação celular. Devido abrangência catalítica das peptidases, elas são utilizadas em diversos processos industriais, como em produção de alimentos, detergentes, rações, farmacêuticas, hidrolisados aplicados a cosméticos, dentre outras (Felix, Noronha e De Marco, 2014).

Estas enzimas são classificadas segundo o tipo catalítico, de acordo com os grupos químicos presentes no centro ativo responsáveis pela catálise da ligação peptídica. Atualmente,

aplicabilidade dos hidrolisados proteicos depende da preservação das propriedades dos peptídeos e aminoácidos gerados. Portanto, o processo de hidrólise deve ser controlado com cautela o que torna as peptidases extremamente interessantes neste processo. A diversidade entre as peptidases quanto sua especificidade é relevante como um guia para selecionar a enzima de acordo com a proteína a ser hidrolisada ou produtos esperados (Rao *et al.*, 1998; Tavano, 2013; Sanghvi *et al.*, 2016).

As peptidases também podem ser aplicadas em processos biotecnológicos de alimentos. Vários efeitos positivos podem ser alcançados utilizando a hidrólise de proteínas feita por peptidases específicas no processamento de alimentos já que sua especificidade por determinado substrato permite o desenvolvimento de hidrolisados proteicos com melhores características nutricionais e química definida. Alguns desses efeitos são: a modificação do valor nutricional, melhorando-o; produção de bioativos (como peptídeos com atividade antioxidante) que conferem propriedades funcionais à proteínas alimentares, melhora na digestibilidade, modificação na qualidade sensorial (como a textura ou sabor) e redução de compostos prejudiciais, como por exemplo as proteínas alergênicas (Tavano, 2013).

As peptidases foram primeiramente aplicadas nas indústrias de detergentes, couro e de produtos alimentícios anos atrás. Alguns exemplos de suas aplicações são as peptidases alcalinas que possuem utilidade removedora de peles de determinados animais, peptidases sendo responsáveis pela coagulação do leite para produzir queijo e, a aplicação da papaína do mamão, que é uma peptidase vegetal, para amaciar carne (Li *et al.*, 2013), também utilizada em produtos cosméticos para esfoliação da pele e com efeito rejuvenescedor, como o produto Papay Enzyme Peel da empresa britânica EMELIS. Outra peptidase com ação endopeptídica de origem vegetal, é a bromelaína comumente extraída do abacaxi, tendo aplicações tanto farmacêuticas quanto para cuidados com a pele, servindo como produtos esfoliantes faciais e corporais, incluindo máscaras, limpadores e removedores de maquiagem (Packianathan e Kandasamy, 2011; Arshad *et al.*, 2014; Saini, Mittal e Rathi, 2016). A Figura 6 sumariza as diferentes aplicações das peptidases.

A aplicação de peptidases para uso comercial requer frequentemente que haja uma elevada atividade em condições não fisiológicas, tais como altas temperaturas e pH, contendo agentes quelantes de cálcio intensivos e, detergentes. A ausência das pressões de seleção durante a evolução natural das peptidases leva essas enzimas a instabilidade ou inatividade nestas condições não fisiológicas (Li *et al.*, 2013). Logo, o interesse por peptidases microbianas vem aumentando assim como sua demanda industrial, pois, os microrganismos representam uma fonte de enzimas estáveis a variações de temperatura e pH devido sua ampla diversidade

bioquímica e facilidade de manipulações genéticas (Rao *et al.*, 1998). Microrganismos termofílicos como fungos e bactérias já foram descritos em métodos industriais para degradar substratos em altas temperaturas, possuindo enzimas termoestáveis (Haki e Rakshit, 2003; Gomes *et al.* 2007), como exemplo, temos a peptidase Arazyme desenvolvida pela InsectBiotech, gerada por microrganismos em simbiose com aranha coreana (*Nephila glavata*). Estas enzimas mantêm-se em temperaturas de 10 a 40°C e, em forma de pó chegam a 120°C resistindo a pHs variáveis desde ácido a básico (pH 4 a pH 12), tendo sua aplicação em variados setores industriais (couro, têxtil, detergentes etc) incluindo o cosmético, comercializada como produtos que removem a camada de queratina suavemente do rosto, promovendo renovação facial (<http://www.insectbiotech.co.kr/>). Além disso, estudos recentes têm expandindo o olhar para gama de variedade de outras classes de peptidases comerciais, principalmente para peptidases modificadas, onde a engenharia de peptidases desenvolve métodos de mutagênese sítio ou de evolução de peptidases podendo gerar funções melhoradas para satisfazer os requisitos de aplicações comerciais específicas. Essa geração de peptidases modificadas apresenta potenciais aplicações devido à especificidade das suas reações individuais de hidrólise poderem ser adaptadas para as necessidades específicas. A plasticidade das peptidases em relação aos seus sítios ativos leva a uma evolução com diferentes graus de especificidade de substratos e seletividade, tornando-as promissoras para novas atividades (Li *et al.*, 2013; Sanghvi *et al.*, 2016).



Figura 7. Visão geral da aplicação das peptidases (Li *et al.*, 2013).

1.5 Microrganismos aplicados à indústria

Atualmente, têm sido utilizados diversos microrganismos para a produção de enzimas e outros metabólitos com aplicabilidade na indústria, que variam desde eucariotos tais como leveduras, algas e fungos a procariotos envolvendo tanto as bactérias Gram positivas quanto as Gram negativas. Enzimas aplicadas à indústria produzidas por microrganismos são originadas de estirpes previamente conhecidas por produzirem enzimas específicas e aplicáveis no mercado. A Tabela 2 mostra alguns microrganismos envolvidos na produção de enzimas industriais (Abd-Elhalem *et al.*, 2015; Singhania *et al.*, 2015).

O mercado mundial de enzimas está em constante desenvolvimento, logo, o isolamento e estudo de microrganismos produtores de enzimas podem ter um impacto significativo em processos industriais atuais e futuros. Hoje em dia as enzimas industriais mais usadas pertencem ao grupo de hidrolases, que explora vários substratos naturais (Mazotto *et al.*, 2013).

Tabela 2. Microrganismos produtores de enzimas aplicáveis à indústria (Singhania *et al.*, 2015 modificado).

Enzimas	Microrganismos
Amilases	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus</i> sp., <i>Bacillus amyloliquifaciens</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus coagulans</i>
Peptidases	<i>B. licheniformis</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. niger</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Penicillium chrysosporium</i> , <i>Rhizopus oligosporus</i> , cepas de actinomicetos
Celulases	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Humicola grisea</i> , <i>Aspergillus</i> sp., <i>Chrysosporium lucknowense</i> , <i>Acremonium</i> sp.
Xilanases	<i>Myceliophthora thermophila</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>A. oryzae</i> , <i>Trichoderma</i> sp.
Lipases	<i>A. oryzae</i> , <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Alcaligenes</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Candida albicans</i> , <i>Rhizopus</i> sp., <i>Mucor</i> sp.

A primeira enzima a partir de um microrganismo utilizada pela indústria foi a subtilisina, uma peptidase alcalina naturalmente produzida por *Bacillus licheniformis* utilizada em formulações de detergentes. Posteriormente, a enzima α -amilase extracelular do *B. licheniformis*, teve sua produção industrial crescente, devido a sua característica termoestável e capacidade de degradar amido em oligossacarídeos facilmente digeríveis. Assim, pela fácil reprodutibilidade e característica termorresistente, as estirpes de *Bacillus* sp. foram exploradas por décadas sendo os principais microrganismos produtores de enzimas (Asgheret *et al.*, 2007; Abd-Elhalem *et al.*, 2015).

Os mecanismos básicos de síntese enzimática são semelhantes o suficiente para permitir um tratamento generalizado sobre os processos de produção microbiológica. Diferenças entre a cinética de produção de diferentes enzimas por diferentes microrganismos existem devido às suas características variadas e padrão de crescimento, o que requer a otimização de cada processo de produção separado (Singhania *et al.*, 2015).

Tecnologias de fermentação têm sido utilizadas exclusivamente para a produção de enzimas industriais, de um modo preferencial para microrganismos tais como bactérias ou fungos sob condições controladas, devido à facilidade de manuseamento e de multiplicação. Normalmente, os microrganismos utilizados pertencem a categoria GRAS (sigla em inglês que significa “geralmente reconhecido como seguro”), especialmente se as enzimas/hidrolisados são aplicadas em indústrias de alimentos e rações. A atenção foi redobrada para o isolamento de microrganismos com propriedades extremofílicas, provenientes de diversos ambientes que vão desde a floresta tropical a região árida e fundo do oceano, pois estes poderiam produzir enzimas com características industriais promissora. Na prática, diversas enzimas microbianas utilizadas industrialmente vêm de um número muito limitado de gêneros, dos quais o *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. e *Kluyveromyces* sp., predominam. Grande parte das estirpes foram, por muitos anos, utilizadas pela indústria alimentar e/ou foram derivadas de mutação e seleção (Sandhay *et al.*, 2005; Singhania *et al.*, 2015).

A seleção da cepa de produção de uma enzima aplicada à indústria é um fator muito importante para tornar um processo industrial bem sucedido. Logo, é preciso observar se a estirpe selecionada produz enzimas extracelulares, uma vez que estas tornam a recuperação do produto muito mais fácil do que quando produzida intracelularmente. Variados microrganismos podem também diferir na sua adequação para a fermentação; as características do processo tais como a viscosidade ou sua capacidade de recuperação e a remoção do organismo também

devem ser considerados antes da seleção. As estirpes industriais produzem tipicamente até 50 g/L de proteína extracelular (Biesebeke *et al.*, 2002; Singhanian *et al.*, 2015).

Fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES) são as duas tecnologias de fermentação principais disponíveis. Ambas as tecnologias oferecem vários benefícios, mas têm suas próprias limitações. Na FS o teor de água livre é muito maior que na FES que é definida como um processo fermentativo que ocorre na ausência ou quase ausência de água livre, e assim o crescimento microbiano e sua consequente formação de produtos ocorre nos substratos sólidos superficialmente. Na fermentação em estado sólido, a matéria-prima funciona como suporte do microrganismo, dos substratos e do produto. Apesar da técnica de FES oferecer vantagens, como por exemplo, a simplicidade do meio, alta concentração dos produtos e baixo consumo de recursos naturais, grande parte das indústrias utiliza fermentação submersa para produção de enzimas devido a facilidade de manuseio e melhor controle do processo (Santos *et al.*, 2008; Singhanian *et al.*, 2010; Agência Embrapa de Informações Tecnológicas (Ageitec)).

Aparentemente, para as indústrias, os microrganismos representam fontes atraentes para produção de novas enzimas, uma vez que podem ser cultivados em grandes quantidades por métodos estabelecidos num tempo relativamente curto, tendo assim uma produção regular, fornecendo enzimas abundantemente. Entre diversas cepas microbianas, bactérias do gênero *Bacillus* são reconhecidas como bons produtores de peptidases extracelulares e, são utilizados em larga escala comercial, como produtor de peptidases por fermentações submersas. Cepas de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* são descritas como queratinolíticas, assim como outras espécies, *B. pumilus* por exemplo. As queratinases obtidas por *Bacillus* sp. são de interesse da indústria devido sua alta facilidade de degradar substratos queratínicos insolúveis. As pesquisas sobre microrganismos queratinolíticos e proteolíticos, estão sendo focadas principalmente em aplicações biotecnológicas que envolvem a hidrólise de queratina (Schallmeyer, Singh e Ward, 2004; Sanghvi *et al.*, 2016) e outras proteínas de interesse industrial, como no setor cosmético. Uma aplicabilidade no setor cosmético desses microrganismos queratinolíticos foi descrito por Villa *et al.* (2013) onde em seu estudo, obteve hidrolisados de queratina através da hidrólise microbiana das penas de frango por fermentação submersa. Tais hidrolisados foram aplicados em diferentes tipos de cabelos através de formulações condicionantes com o intuito da reconstrução da fibra capilar danificada.

2. JUSTIFICATIVA

Hidrolisados proteicos são um dos principais ingredientes ativos em formulação cosmética para hidratação de pele e cabelos. Considerando o posicionamento do Brasil no mercado mundial de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC), pesquisas para o desenvolvimento de novos insumos ou de novas metodologias de produção alinhadas às demandas do mercado, são vitais para manter o crescimento do setor.

A busca por cosméticos que não tenham origem animal, vem aumentando gradativamente e, a utilização de hidrolisados de origem vegetal em produtos para cuidados capilares como xampus e condicionadores com capacidade reconstrutora e hidratante cresce proporcionalmente. Apesar de enzimas microbianas já serem utilizadas comercialmente, há poucos esforços na utilização de processos fermentativos na obtenção de hidrolisados de origem vegetal para cosméticos. E com isso, iniciamos a seleção de microrganismos capazes de produzir peptidases que participam da hidrólise de substratos vegetais, tais como a soja, gerando hidrolisados aplicáveis a produtos capilares. Desta forma, este estudo está direcionado para produção de hidrolisados proteicos a partir de proteína de soja. Mesmo sendo a proteína de soja amplamente utilizada, há poucos estudos sobre a utilização de processos fermentativos na produção de seus hidrolisados. A primeira etapa do projeto se propôs a selecionar e identificar as cepas de microrganismos produtores das enzimas de interesse a partir da coleção de cultura do nosso laboratório (Bioinnovar - Unidade de Bioprocessos, Bioprodutos e Bioenergia). Na segunda etapa, as amostras com melhor atividade proteolítica foram testadas quanto à utilização de proteína de soja na produção de hidrolisados. A etapa seguinte visou analisar os peptídeos e aminoácidos gerados através de MALDI- TOF/TOF e cromatografia em camada delgada. Paralelamente, o perfil das proteases produzidas também foi observado, assim como sua atividade através de dosagens. Os dados gerados pelo projeto permitirão o uso destes hidrolisados em formulações de cosméticos para serem testados em mechas de cabelos em projetos futuros.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Baseado na demanda por hidrolisados de origem vegetal e por um processo sustentável de produção de hidrolisados, o objetivo deste trabalho é selecionar cepas de *Bacillus* sp. proteolíticos com capacidade de hidrolisar a proteína de soja e obter como produto, hidrolisados proteicos com baixa massa molecular para futura aplicação em produtos para cuidado capilar.

3.2 Objetivos específicos

Tendo em vista a aplicabilidade dos hidrolisados de soja em cosméticos e o uso potencial de processos fermentativos para a sua obtenção, os objetivos deste trabalho são:

- Selecionar dentre os microrganismos da coleção de cultura do laboratório Bioinnovar, cepas de microrganismos produtores de peptidases através da hidrólise de caseína em ágar;
- Selecionar microrganismos com alta atividade proteolítica sobre proteína de soja;
- Identificar os principais aminoácidos gerados pela hidrólise microbiana da soja através de HPTLC;
- Quantificar os aminoácidos gerados pela hidrólise através da dosagem de ninidrina;
- Verificar a massa dos peptídeos gerados pela hidrólise microbiana através de MALDI-TOF/TOF;
- Analisar produção das enzimas envolvidas na degradação dos substratos através de análises quantitativas (ensaios enzimáticos) e qualitativas (zimografias), ambos com substrato gelatina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

As amostras utilizadas foram 27 cepas da coleção de cultura laboratório Bioinnovar, conforme mostra a Tabela 3. As amostras AMR, B2, PP3, FP4E, FP4C, ABV e GLI são bactérias descritas como queratinolíticas (Mazotto *et al.*, 2011; Cedrola *et al.*, 2012; Mazotto *et al.*, 2013,).

Tabela 3. Microrganismos da coleção de cultura do laboratório Bioinnovar utilizados na seleção de produtores de peptidases.

Microrganismos	Local de isolamento	Identificação
Fabi 04, C2, Fabi 14, B3, Fabi 16, C5, Bac.B2	Efluente do processo de depenação industrial de aves	Não identificadas
Lã P2, Lã P18, Lã P1, Lã P17.1, Lã P18.2, Lã P8, Lã P6, Lã P5, Lã P14, Lã P16 e Lã P4	Lã de ovelha	Não identificadas
EL05	Efluente de depenação de aves	<i>Bacillus</i> sp. EL05
EL06	Efluente de depenação de aves	<i>Bacillus</i> sp. EL06
EL07	Efluente de depenação de aves	<i>Bacillus</i> sp. EL07
AMR	Penas de frango de corte	<i>Bacillus subtilis</i> LFB-FIOCRUZ 1266
B2	Penas de frango de corte	<i>Bacillus cereus</i> LFB-FIOCRUZ 1268
PP3	Penas de frango de corte	<i>Bacillus subtilis</i> LFB-FIOCRUZ 1273
FP4E	Penas de frango de corte	<i>Bacillus subtilis</i> LFB-FIOCRUZ 1271
FP4C	Penas de frango de corte	<i>Bacillus subtilis</i> LFB-FIOCRUZ 1270
ABV	Penas de frango de corte	<i>Bacillus licheniformis</i> LFB-FIOCRUZ 1269
Controle (GLI)	Penas de frango de corte	<i>Bacillus subtilis</i> LFB-FIOCRUZ 1267

4.2 Seleção de microrganismos produtores de peptidases

Visando a seleção de microrganismos produtores de peptidases, 27 cepas da coleção de cultura laboratório Bioinnovar foram cultivadas em meio específico para observação da formação de zona de hidrólise. O meio caseína 1% (leite em pó desnatado) foi utilizado para observação de microrganismos produtores de peptidases e, o experimento foi conduzido em triplicata. Foram inoculados 10 µL de uma suspensão das amostras em cada poço do ágar. As placas foram incubadas durante 24 horas a 28°C. Após a incubação, foi realizada a medição dos halos (zona de hidrólise). Para verificação da atividade é observado a transparência do meio de cultura ao redor do poço onde foi aplicado a amostra microbiana.

Tabela 4. Meio Caseína 1%

Reagente	Concentração (%)
Extrato de levedura	0,1
NaCl	0,85
Leite em pó	1,0
Ágar	2,0

4.3 Hidrólise microbiana de proteína de soja

Os microrganismos com as maiores zonas de hidrólise em relação ao diâmetro da colônia, foram selecionados e 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 com salina (NaCl 0,85%) estéril (4000 rpm/ 20 min) e inoculadas em meio soja [proteína de soja 1% (Casas Pedro), 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 incubar por 5 dias a 28°C sob agitação de 200 rpm, o meio fermentado foi submetido a centrifugação (4000 rpm/ 20 min) e o sobrenadante de cultura foi analisado quanto a concentração de proteínas, presença de proteínas por SDS-PAGE, concentração de aminoácidos totais, presença de aminoácidos por TLC, análise dos peptídeos por espectrometria de massas e presença e quantificação de peptidases.

4.4 Dosagem da concentração de proteínas

As amostras foram analisadas quanto a concentração de peptídeos (Lowry *et al.*, 1951), utilizando albumina bovina como padrão (BSA) lidas a 617 nm.

4.5 SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

O extrato enzimático foi diluído em tampão da amostra para proteínas (Tris-HCl 0,15% pH 6,8, SDS 0,5%, glicerol, mercaptoetanol 3,4% e azul de bromofenol 0,3%), aquecida a 100°C por cinco minutos para desnaturação das proteínas, e aplicada (40µg) no gel de poliacrilamida a 15%. A corrida foi realizada a 120V por 1 hora, e o gel foi incubado em solução de Comassie Blue [5mL de solução estoque (Comassie Blue 2%); 4mL de ácido acético; 20 mL de metanol e 11mL de água destilada] *overnight* e descorado com a solução metanol: ácido acético: água (50:10:40 v/v/v) sob agitação (70 rpm/min) até o aparecimento de bandas (Laemmli, 1970). Foi utilizado como padrão de peso molecular: miosina (200 kDa), β-galactosidase (116 kDa), fosfolipase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), lisozima (14,4 kDa) e aprotinina (6,5 kDa) (Bio-Rad).

4.6 Análise em MALDI-TOF

A espectrometria de massa foi utilizada para avaliar as massas dos fragmentos peptídicos gerados pela hidrólise da proteína de soja pelas peptidases das melhores amostras. As amostras foram parcialmente purificadas em ZipTip C₁₈ seguindo o protocolo do fabricante. As amostras purificadas foram incorporadas as matrizes de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (5µg/mL em TFA 0,1% em ACN 50%) ou ácido sinapínico (10µg/mL em TFA 0,1% em ACN 50%), na proporção 1:1. A mistura foi aplicada na placa para análise por MALDI-TOF (*Matrix assisted laser desorption/ionisation – Time of flight*). As análises foram feitas no CEMBIO, UFRJ.

4.8 Cromatografia em camada fina

A cromatografia em camada fina (TLC) foi utilizada para avaliar o perfil cromatográfico do hidrolisado obtido. Foram utilizadas placas de vidro de HPTLC (Merck) comerciais. Os solventes que foram utilizados para a fase móvel são butanol: acetona: ácido acético glacial: água (5:5:1:3,7v/v/v/v). Como revelador foi empregada a solução de ninhidrina em butanol-acetona (3,75 g de ninhidrina, 25 mL de butanol e 25 mL de acetona). Na placa de HPTLC foram aplicados 10 µL das amostras. Os aminoácidos isolados utilizados como padrão foram alanina (Ala), arginina (Arg), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys), ácido glutâmico (Glu),

glicina (Gly), histidina (His), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr), tirosina (Tyr), valina (Val) e triptofano (Trp).

4.9 Dosagem de Ninidrina

Para a detecção de aminoácidos totais foi realizada dosagem de ninidrina. As amostras foram diluídas em água destilada (0,5 ml de amostra para 4,5 ml de água) e, logo após foi adicionado 1ml de ninidrina (0,35g em 100ml de isopropanol) em tubos de ensaio. A reação ocorreu sob suave agitação à 84°C durante 10 minutos e com os tubos devidamente tampados (para não correr o risco de evaporação das amostras). Logo após resfriar em temperatura ambiente, foi adicionado em cada tubo de ensaio 1mL de etanol a 50%. Foi utilizado para curva padrão diluições de uma solução de 0,15 mg/ml de glicina. A absorbância foi registrada em um espectrofotômetro a 570 nm (Hwang e Ederer, 1975; Meyer, 1957).

4.10 Ensaio de atividade proteolítica

O ensaio da atividade proteolítica foi realizado para mensurar a atividade proteolítica das peptidases geradas pelos microrganismos selecionados na presença de soja. Para 100µL de sobrenadante de cultura (ou extrato enzimático) foram acrescentados 400µL de tampão fosfato pH 7,4 (Na₂HPO₄ 0,06M e KH₂PO₄ 0,04M) e 750µL de gelatina a 1%. A mistura de reação foi incubada a 37°C por 30 minutos, e 375µL desta solução foi colocada em tubos contendo 500µL de isopropanol. O branco é obtido pelo acréscimo de 375 µL de mistura de reação antes da incubação. Após o período de incubação, os tubos foram deixados por 15 minutos na geladeira e então foram centrifugados (10000 rpm/ 5 min). Uma alíquota do sobrenadante (40 µL) foi usado para dosar proteína pelo método de Lowry. A leitura foi realizada a 617nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como o aumento de 1µg de proteína nas condições do teste (Jones *et al.*, 1998; Lowry, 1951).

4.11 Zimografia com substrato gelatina

Aos sobrenadantes de cultura foram adicionados tampão da amostra para peptidases (tampão Tris-HCl 0,32M, pH 6,8; glicerol; dodecil sulfato de sódio 8% e azul de bromofenol 0,06% p/v) na proporção 75:25 (amostra: tampão). As amostras foram aplicadas (10 µL) no gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970) a 12,5% contendo 0,1% (p/v) de gelatina co-polimerizada. A corrida foi realizada a 150V por 1 h a 4°C. Após a corrida, os géis foram devidamente lavados com Triton X-100 2,5% (v/v) duas vezes por 15 minutos sob agitação (70 rpm/ min) para a remoção do SDS. Em seguida os géis foram incubados por 48 horas a 37°C em tampão Tris-

HCl 10mM pH 7,2. Para detecção da atividade proteolítica, os géis foram corados com Comassie Blue [5mL de solução estoque (comassie blue 2%); 4mL de ácido acético; 20 mL de metanol e 11mL de água destilada] *overnight* e descorados com a solução metanol: ácido acético: água (50:10:40 v/v/v) sob agitação até o aparecimento de bandas de degradação (Heussen e Dowdle, 1980).

5. RESULTADOS

5.1 Seleção de microrganismos proteolíticos

As amostras foram avaliadas quanto seu potencial para produção de peptidases extracelulares a partir do cultivo em meio ágar caseína a temperatura ambiente por 24h, quando foram avaliadas através da formação de zona de hidrólise. A zona de hidrólise é mensurada pela medição do diâmetro dos halos transparentes formados em volta dos poços feitos no meio ágar caseína. Através dessa medição, observou-se que, das amostras analisadas, 17 produziram peptidases. Destacaram-se na produção de peptidases as amostras B3, EL06, B2, EL05, Lã P8, AMR, PP3, Bac.B2, EL07 e C2, por terem produzido maiores diâmetros de zona de hidrólise entre 15 a 20 mm, sendo maiores que do próprio controle positivo (GLI) (Figura 8). Logo, após essa seleção das produtoras de peptidases, as amostras foram avaliadas quanto ao seu potencial de hidrólise de proteína de soja.

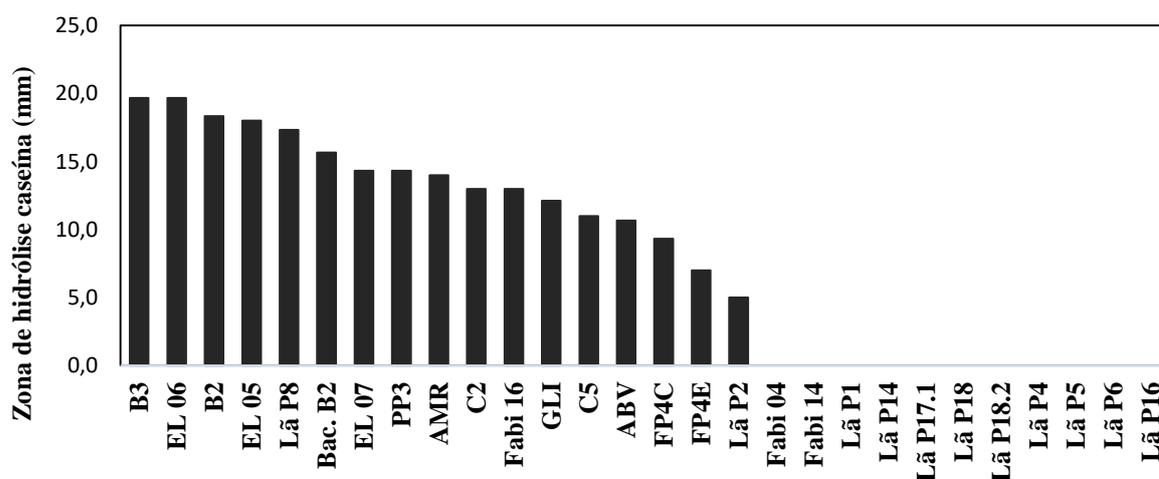


Figura 8. Medidas de zona de hidrólise em meio sólido contendo caseína como substrato. As amostras (tabela 3) foram cultivadas em poços em meio ágar-caseína por 24h a 28°C.

5.2 Quantificação dos peptídeos produzidos por fermentação submersa de proteínas de soja com cepas selecionadas

As dez amostras com as maiores concentrações de proteína foram selecionadas para cultivo em meio contendo proteína de soja 1% como principal fonte de carbono, objetivando determinar as melhores cepas para a produção de hidrolisados de soja. Para tal, vários parâmetros foram avaliados e um deles foi a concentração final de proteínas totais ao final do período de incubação (Figura 9). Os resultados mostraram que, durante a fermentação, houve o

consumo do substrato, que é parcialmente solúvel. O meio sem inóculo (controle negativo) apresentou 4,95 mg/mL de proteínas solúveis totais. As amostras analisadas apresentaram concentração de proteínas solúveis totais variando de 2 a 5 mg/mL. As cepas com os maiores valores de proteínas no sobrenadante de cultura foram EL07 (4,84mg/mL), AMR (4,08 mg/mL), PP3 (3,75 mg/mL) e B2 (3,49 mg/L). A melhor cepa para a produção de hidrolisados de soja deve transformar as proteínas de soja em peptídeos de massa molecular reduzida e aminoácidos sem, no entanto, consumir excessivamente o substrato, o que acarreta baixos rendimentos de processo. As amostras Bac.B2, EL05, C2, EL06, B3 e LãP8 consumiram 40% ou mais das proteínas solúveis presentes no meio.

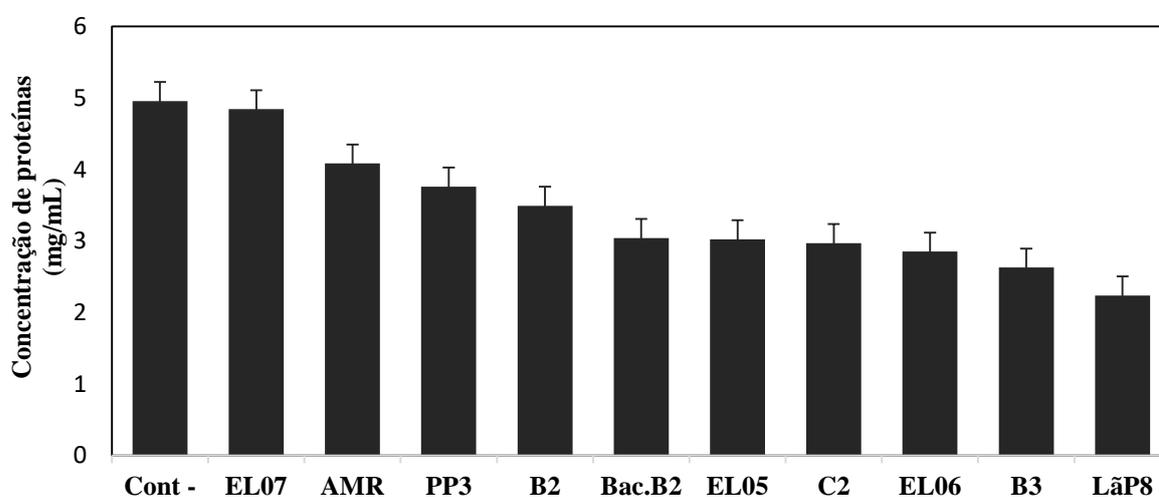


Figura 9. Concentração de proteínas totais do sobrenadante do cultivo de diferentes cepas bacterianas em meio soja. As cepas foram cultivadas em meio soja por 5 dias a 28h, e após este período foram centrifugadas e analisadas quanto a concentração de proteínas pelo método de Lowry. Controle negativo: Cont -

5.3 Avaliação dos peptídeos gerados por SDS-PAGE

A análise por SDS-PAGE do sobrenadante de cultura obtido após fermentação em meio soja foi realizada para determinar a presença de proteínas com massa molecular acima de 10 kDa, ou a sua ausência, que indica sua possível hidrólise. Nesta análise a mesma quantidade de proteínas (40µg) foi aplicada para todas as amostras. Como observado na Figura 10, o controle negativo (meio sem inóculo) apresentou muitas bandas migrando de 21 a 200 kDa (limites de detecção do sistema), dificultando a visualização e separação das mesmas. Entretanto é possível observar acúmulos de bandas de alta massa molecular migrando nas faixas de aproximadamente 30, 40 e 100 kDa. Após a fermentação, estas grandes quantidades de proteínas não foram mais observadas por nenhuma das amostras testadas, apontando sua degradação em peptídeos de massa inferior a 21 kDa. As bandas que observadas no gel podem representar não apenas

proteínas provenientes da soja, mas podem representar também enzimas produzidas pelos microrganismos que podem estar envolvidas na hidrólise da soja.

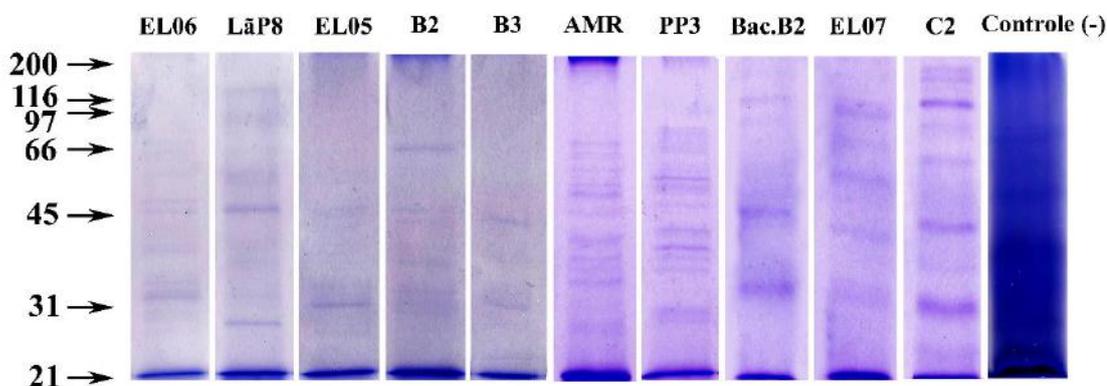


Figura 10. Gel de SDS-PAGE do sobrenadante de cultura das cepas proteolíticas testadas cultivadas em meio soja. As cepas apresentaram bandas fracas quando comparados ao controle negativo (meio sem inóculo), indicando hidrólise das proteínas do meio. O gel continha malha de poliacrilamida de 15% e o limite mínimo de detecção foi de 21 kDa.

5.4 Avaliação dos peptídeos gerados por espectrometria de massa

Análise por espectrometria de massa pelo método de MALDI-TOF foi realizada para mensurar de forma quantitativa as massas moleculares dos hidrolisados da proteína de soja gerados após fermentação. As três amostras que apresentaram as maiores concentrações de peptídeos solúveis no sobrenadante de cultura, dentre as dez do estudo, foram selecionadas para esta análise. Estas amostras são AMR, EL07 e PP3.

A Figura 11 mostra a análise dos peptídeos do meio de proteína de soja sem ter sido submetido a fermentação (controle negativo) que, apresentaram alta concentração de massas moleculares de 3290 Da a 9000 Da. Foram observados também peptídeos com alta massa molecular variando de 10000 Da a 24000 Da. Após fermentação, as massas moleculares desses peptídeos sofreram uma drástica redução, como visto na análise da amostra AMR onde, tais peptídeos apresentam massas moleculares que variam de 873 Da a 2000 Da, o que os caracterizam como hidrolisados de baixa massa molecular (Figura 12). A análise da amostra EL07 apresentou peptídeos com massas moleculares variando de 773 Da a 2000 Da, indicando a presença de peptídeos com baixa massa molecular presentes no sobrenadante de cultura dessa amostra após 5 dias de cultivo em meio contendo proteínas de soja (Figura 13). Já a análise da amostra PP3 mostrou alta concentração de peptídeos de massas moleculares de 726 Da a 1800 Da, aproximadamente, como observado na figura 14.

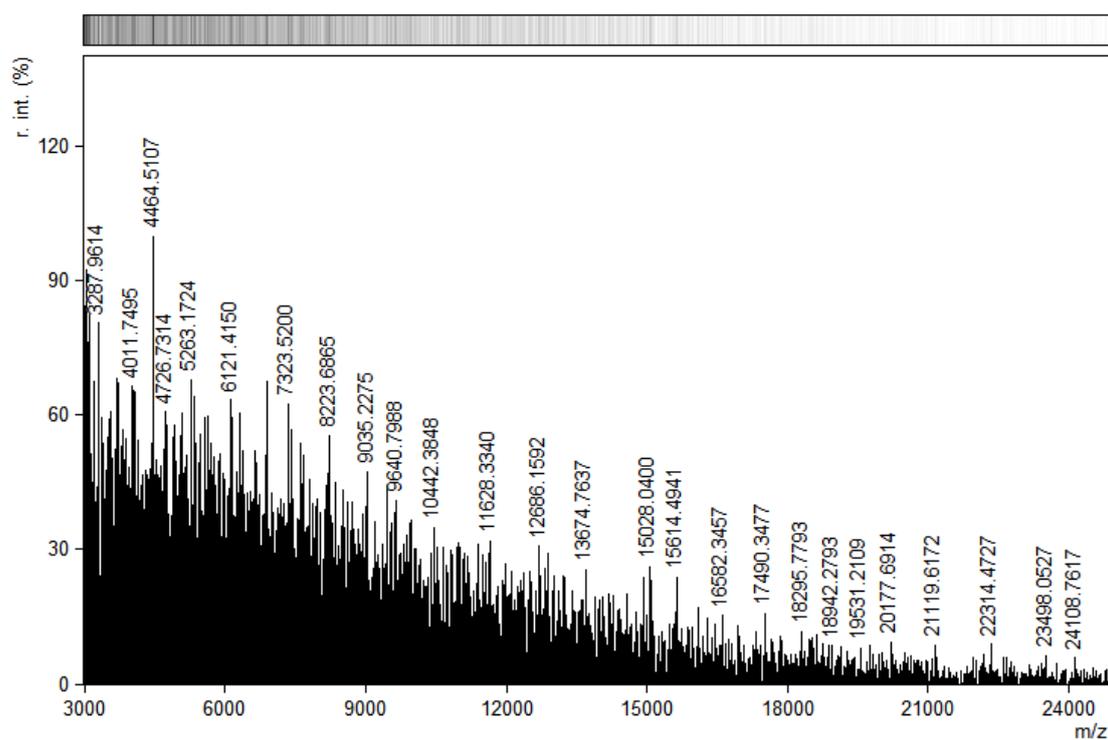


Figura 11. Análise por MALDI-TOF dos peptídeos contidos no meio proteína de soja 1% sem inóculo: Controle negativo.

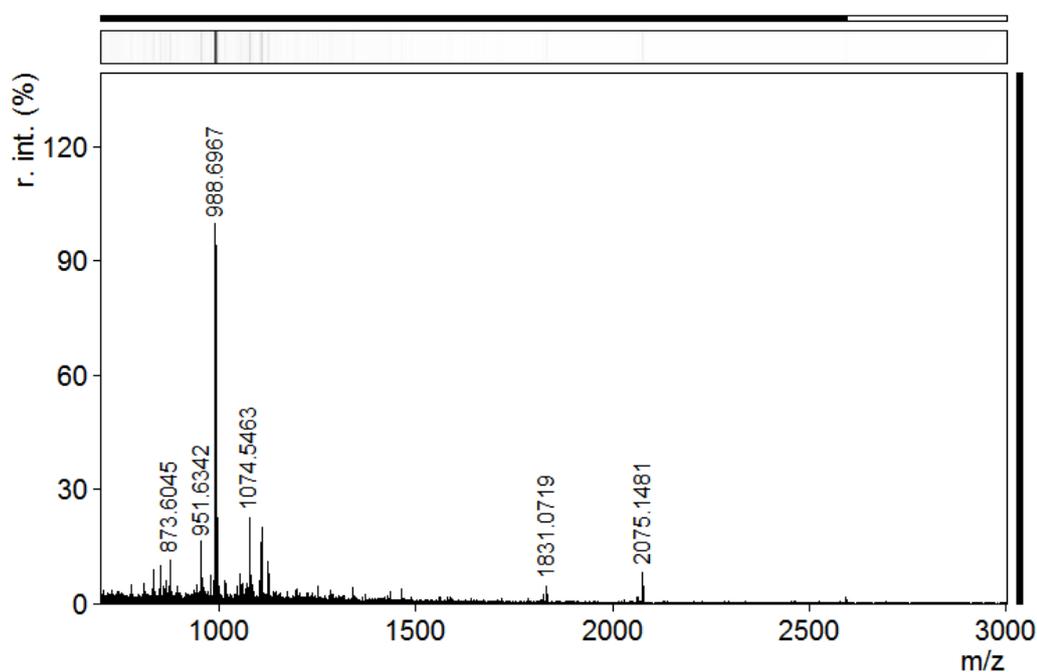


Figura 12. Análise por MALDI-TOF dos peptídeos gerados por fermentação submersa de proteína de soja na presença de *Bacillus subtilis* AMR.

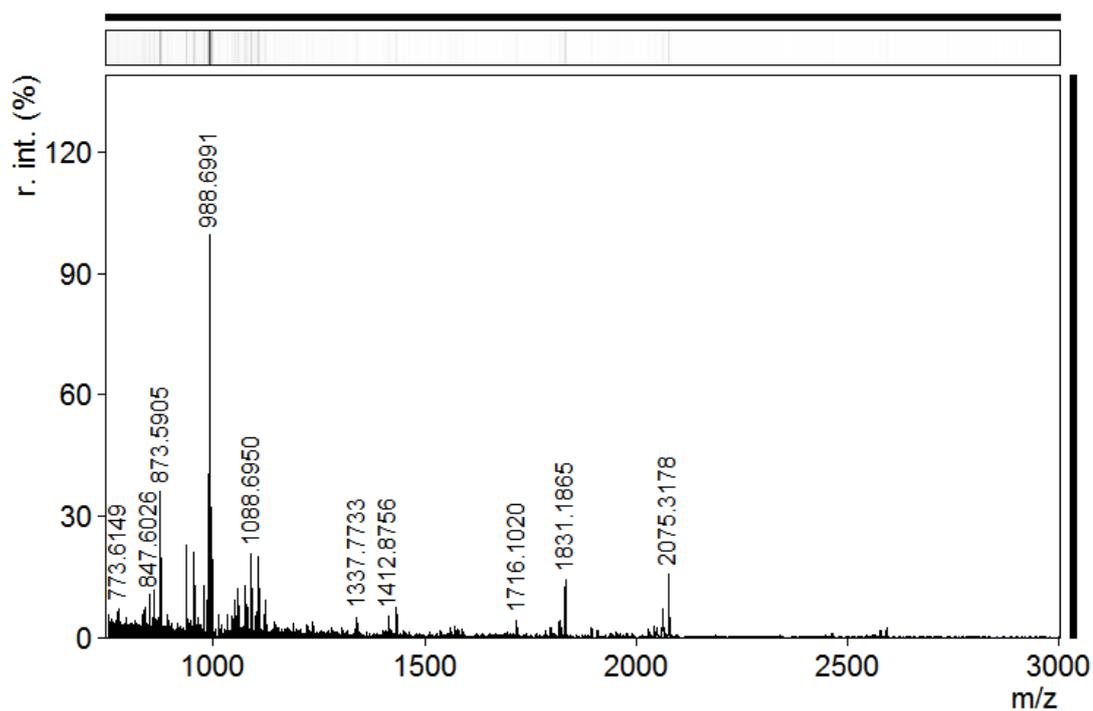


Figura 13. Análise por MALDI-TOF dos peptídeos gerados por fermentação submersa de proteína de soja na presença de *Bacillus* sp. EL07.

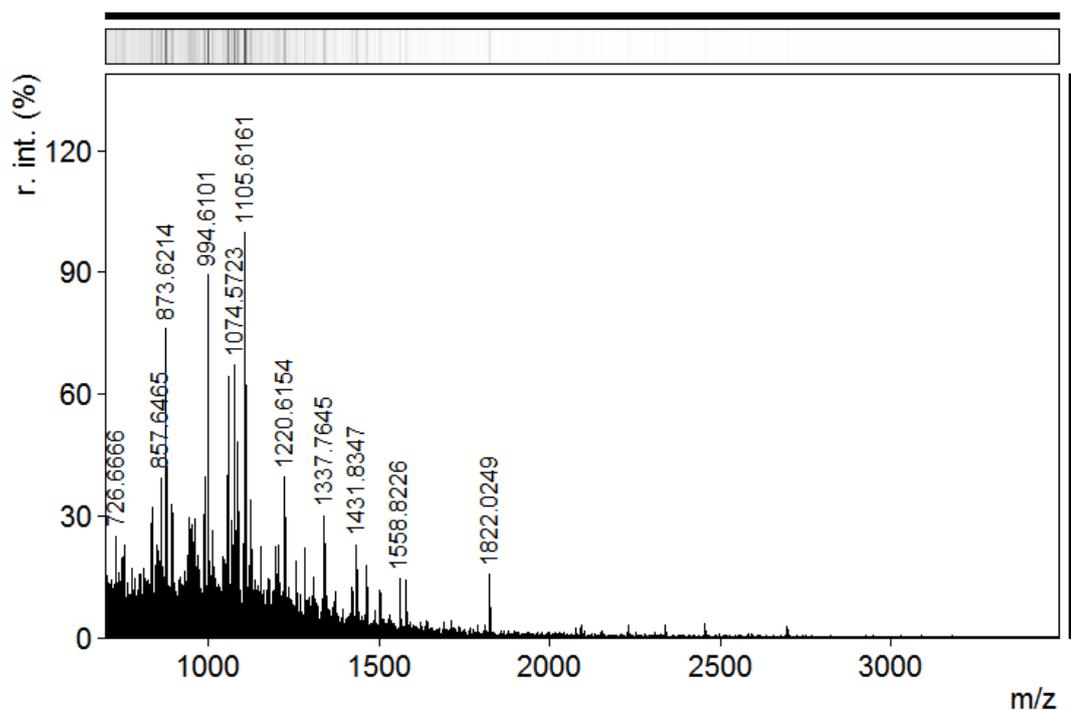


Figura 14. Análise por MALDI-TOF dos peptídeos gerados por fermentação submersa de proteína de soja na presença de *Bacillus subtilis* PP3.

Apesar de todas as amostras analisadas apresentarem peptídeos de baixa massa molecular, a PP3 mostrou uma diversidade maior de picos provenientes, provavelmente da hidrólise da proteína de soja a peptídeos de massas moleculares inferiores a 2 kDa, sendo um resultado promissor para aplicabilidade em formulações para produtos capilares. Porém, um planejamento experimental e otimização do processo precisa ser realizado para determinar as ótimas condições de produção e rendimento.

5.5. Determinação dos aminoácidos presentes nos hidrolisados por Cromatografia em camada fina (TLC)

A análise por cromatografia em camada fina foi realizada para determinar de modo qualitativo, os aminoácidos presentes em maiores concentrações nos hidrolisados de proteína de soja. As amostras foram aplicadas em placas de sílica gel (HPTLC) em conjunto com os aminoácidos padrões. Após corrida e a revelação com ninidrina, o cálculo de fator de retenção (Rf) ou retardamento foi realizado para determinar comparativamente quais aminoácidos estavam presentes em cada amostra.

A Tabela 5, mostra os aminoácidos presentes majoritariamente nos hidrolisado de proteína de soja obtidos com as cepas em teste no estudo. O ácido glutâmico foi encontrado em quase todas as amostras incluindo o controle negativo. As amostras AMR e EL07 aparentaram maiores quantidades de aminoácidos diferentes em seus hidrolisados detectáveis por TLC.

Tabela 5. Análise dos aminoácidos contidos nos hidrolisados de proteína de soja.

Amostras	Aminoácidos
EL07	Histidina, glutamina, alanina, tirosina, cistina
EL06	Histidina, fenilalanina, ácido glutâmico, cistina
EL05	Ácido glutâmico, leucina, fenilalanina
PP3	Serina, fenilalanina, cistina
C2	Ácido glutâmico, triptofano
Bac.B2	Triptofano
LãP8	Cistina, ácido aspártico, ácido glutâmico, leucina
B2	Ácido glutâmico, leucina
B3	Ácido glutâmico, leucina, fenilalanina
AMR	Tirosina, cisteína, lisina, treonina, fenilalanina
Controle -	Ácido glutâmico, ácido aspártico, leucina

5.6. Quantificação dos aminoácidos totais produzidos por fermentação submersa de proteínas de soja

O método quantitativo utilizando ninidrina para mensurar a concentração de aminoácidos totais contidos nas amostras de hidrolisados de proteína de soja foi realizado. A Figura 15 mostra que houve um aumento de aminoácidos em todas as amostras em relação ao controle negativo, indicando a hidrólise da proteína da soja. Esses resultados corroboram com os demais resultados observados. Comprovando que há a hidrólise das proteínas da soja com produção de peptídeos de baixa massa (observados através de SDS-PAGE e MALDI-TOF) e de aminoácidos (TLC e dosagem de aminoácidos totais).

A amostra EL07 apresentou a maior concentração de aminoácidos (3,47 mg/mL), um valor 9,3 vezes maior que o observado no controle negativo (sem inóculo). As amostras EL05 e EL06 também apresentaram altas concentrações de aminoácidos (3 mg/mL e 3,1 mg/mL, respectivamente).

As amostras AMR e PP3, que apresentaram altas concentrações de proteínas solúveis no sobrenadante de cultura (Figura 7) não apresentaram resultados tão expressivos na quantificação de aminoácidos totais, apesar de tê-los de boas concentrações, 1,9 e 1,7 mg/mL, respectivamente, valores mais que 5 vezes o observado no controle negativo. Essa diferença pode ser explicada pela atividade das peptidases produzidas pelos microrganismos e hidrólise do substrato em peptídeos (endopeptidases) ou aminoácidos (exopeptidases) por elas.

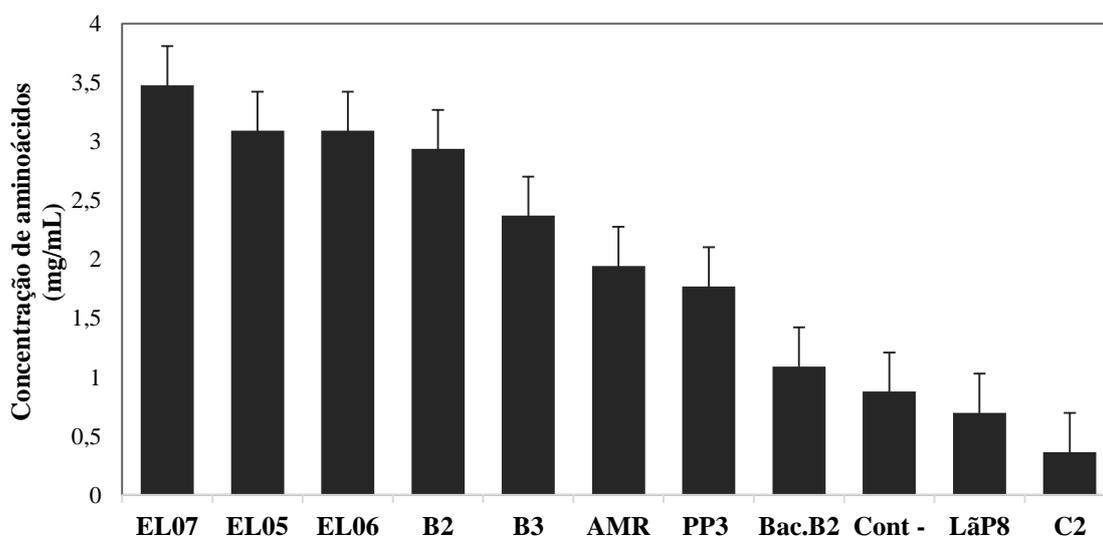


Figura 15. Concentração de aminoácidos totais obtidos por fermentação submersa de proteína de soja.

5.7 Produção de peptidases na presença de proteína de soja

Concomitantemente, a produção de peptidases também foi avaliada, tanto quantitativamente (figura 16) quanto qualitativamente (Figura 17). As peptidases, além de protagonistas no processo de hidrólise da proteína de soja, também pode ser um produto com valor agregado.

A figura 16 mostra a relação entre as amostras quanto suas respectivas atividades proteolíticas. É possível observar que as amostras EL06, EL07 e C2 foram as que apresentaram maiores atividades em detrimento as outras amostras. A amostra EL06 apresentou 6000 U/mL; EL07 apresentou aproximadamente 5500 U/mL; e a amostra C2 teve atividade de 4500 U/mL.

Quando os resultados de atividade proteolítica são comparados com a concentração de proteínas, algumas amostras que apresentaram alta concentração de peptídeos no sobrenadante de cultura (como por exemplo a amostra AMR) não apresentaram atividade enzimática tão alta comparativamente em relação as demais amostras. O inverso também foi observado (como por exemplo a amostra EL06). Estes resultados indicam que não há uma correlação direta entre a atividade proteolítica e a concentração de peptídeos solúveis. Vários possíveis fatores podem explicar o fato, como a especificidade, afinidade e velocidade de conversão da enzima (k_m e k_{cat}) frente as proteínas da soja (diferente da gelatina utilizada como proteína padrão em nossos testes de atividade). A velocidade de crescimento e consumo dos peptídeos gerados também podem explicar as diferenças em relação a concentração de proteínas e atividade observadas nos testes. Entretanto, não é possível obter conclusões a este respeito com os resultados obtidos, e outros estudos poderão ser realizados para apurar estas diferenças.

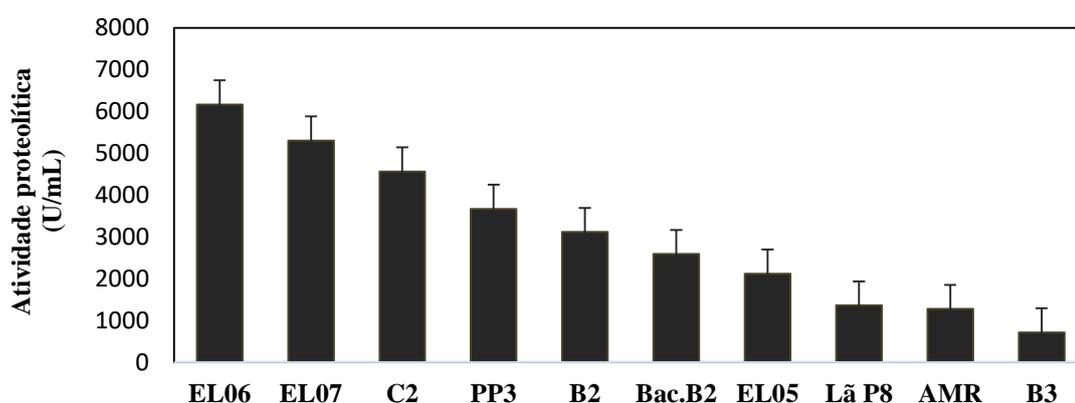


Figura 16. Atividade proteolítica do sobrenadante de culturas das amostras testadas quando cultivadas na presença de proteína de soja como principal substrato.

Também foi realizada a análise zimográfica das peptidases produzidas pelas amostras. A zimografia foi o método qualitativo utilizados para avaliar a produção de peptidases extracelulares e traçar suas massas moleculares. Na Figura 17, podemos observar que amostras como B2, EL06, PP3 e AMR apresentaram um perfil de múltiplas bandas migrando na faixa de 20 a 94 kDa, assim como as amostras B3 e EL05, que apresentaram também uma banda migrando em aproximadamente 7kDa. As amostras Bac.B2, EL07 e C2 apresentaram bandas com massa molecular superior à 100 kDa, tendo a amostra C2 uma peptidase de alta massa, migrando próximo ao topo do gel (>200 kDa). Não foi observada peptidases extracelulares pela Lã P8 nas condições testadas.

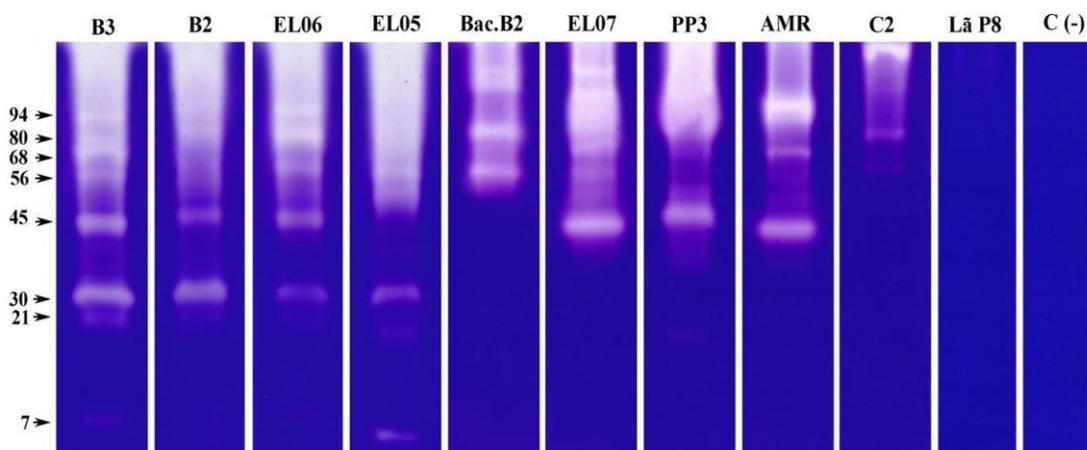


Figura 17. Zimograma com substrato gelatina das peptidases produzidas na presença de soja como substrato. A esquerda estão as massas moleculares calculadas.

6. DISCUSSÃO

A demanda por cosméticos que não sejam testados em animais e por componentes proteicos que não tenham uma origem animal, vem aumentando ao decorrer dos anos e, com isso, a utilização de hidrolisados de origem vegetal em produtos para cuidados capilares como xampus e condicionadores com capacidade reconstrutora e hidratante cresce proporcionalmente. As proteínas nestes cosméticos necessitam ter baixa massa molecular para serem incorporadas na fibra capilar, pois aumenta a sua solubilidade e absorção (Villa *et al.*, 2013). E, para isso, são aplicados métodos de hidrólise tanto químicos quanto enzimáticos. Hidrólises químicas apesar de baixo custo e rápidas, são nocivas para o ambiente e, no processo de hidrólise proteica, pode-se perder aminoácidos ou modificar sua estrutura. Logo, hidrólises enzimáticas são requeridas por serem mais específicas a seus substratos, conservando os aminoácidos lábeis como a fenilalanina, histidina e arginina, reduzindo, também, significativamente as perdas de tirosina durante a hidrólise ácida (Gehrke *et al.*, 1985), além de ser um método sustentável.

A hidrólise por microrganismos é um método que vem gradativamente ampliando na indústria. Obtêm-se o hidrolisado a partir das enzimas secretadas pelo microrganismo durante a fermentação e, com isso, este trabalho se ateve a selecionar microrganismos proteolíticos com capacidade de degradar proteína de soja para gerar hidrolisados aplicáveis a produtos capilares. O primeiro passo para seleção foi o *screening* inicial das cepas do laboratório Bioinnovar, onde 27 microrganismos – maioria do gênero *Bacillus* – que foram cultivados em ágar caseína para detecção de peptidases extracelulares. A leitura após incubação mostrou halos delimitados e transparentes, denominados zonas de hidrólise e, a observação e a medição dessas zonas de hidrólise aparentes na placa de ágar caseína, mostra a capacidade desses microrganismos de degradarem a fonte de proteína fornecida (caseína), indicando a produção de peptidases extracelulares. As amostras B3 (não identificada), *Bacillus* sp. EL06 (EL06), *Bacillus cereus* LFB-FIOCRUZ 1268 (B2), *Bacillus* sp. EL05 (EL05), LãP8 (não identificada), *Bacillus subtilis* LFB-FIOCRUZ 1266 (AMR), *Bacillus subtilis* LFB-FIOCRUZ 1273 (PP3), Bac.B2 (não identificada), *Bacillus* sp. EL07 (EL07) e C2 (não identificada) destacaram-se quanto a produção de peptidases, apresentando halos de 15 a 20 mm enquanto o controle positivo (*Bacillus subtilis* GLI) apresentou aproximadamente 13 mm. Trabalho prévio da equipe Bioinnovar, feito por Mazotto *et al.* (2013), relataram a atividade proteolítica com substratos gelatina e queratina do fungo *Aspergillus niger* apresentando halos transparentes e em tamanhos de 37 mm e 35 mm em meios ágar gelatina e queratina, respectivamente. Indicando uma potencial produção de peptidases e queratinases extracelulares. Sharma *et al.* (2015) isolaram

tanto bactérias quanto fungos do solo e, elucidou suas atividades proteolíticas realizando, inicialmente, um *screening* de produção de peptidases. Para tal, utilizou meio ágar gelatina e meio leite desnatado (caseína). No ágar gelatina, houve uma maior clareza na aparência dos halos transparentes (zonas de hidrólise), sendo considerado o melhor substrato para ensaio qualitativo de detecção de peptidases neste estudo. O resultado obtido em relação a produção de peptidases foi esperado, visto que microrganismos do gênero *Bacillus* (*B. cereus*, *B. sterothermophilus*, *B. mojavensis*, *B. megaterium* e *B. subtilis*) que, são comumente encontrados em solos, produzem uma grande variedade de enzimas extracelulares, incluindo peptidases (Josephine *et al.*, 2012; Prasanth *et al.*, 2016).

Foram escolhidas 10 amostra a partir dos resultados em ágar caseína para a fermentação submersa em meio contendo proteína de soja 1%. Após fermentação, os hidrolisados de proteína de soja foram avaliados quanto a concentração de proteínas e observou-se que as amostras EL07, AMR, PP3 e B2 apresentaram bons resultados em relação a concentração de proteínas (4,84, 4,08, 3,75 e 3,49 mg/mL, respectivamente). Grozeva, Tchorbanov e Aleksieva (1994) analisaram o potencial das peptidases extracelulares do fungo *Humicola lutea* de hidrolisar caseína por fermentação submersa. E, foi visto que o conteúdo proteico solúvel em pH neutro a alcalino, foi diminuindo em aproximadamente 3 dias de cultivo, gerando em torno de 1,4 mg/mL hidrolisados de caseína. Mazotto *et al.* (2010) descreveram a capacidade da cepa *Bacillus subtilis* AMR de produzir hidrolisados a partir do substrato proteico de queratina, que diferente da proteína de soja e caseína, é insolúvel. O objetivo era avaliar degradação de queratina de cabelo. Os resultados da concentração de proteína obtidos em 4 dias, demonstrou um aumento de hidrolisados (~ 0,7 mg/mL) em comparação ao controle negativo (meio sem inóculo). O mesmo não pode ser observado no presente trabalho pois, a soja é parcialmente solúvel, logo o controle negativo apresenta uma alta concentração de proteínas quando comparado as amostras. Uma possível explicação é que os microrganismos presentes no meio consumiram parte dos hidrolisados. Sendo assim, quando comparados os hidrolisados obtidos pela cepa LãP8 com os das cepas EL07, AMR, PP3 e B2, observa-se uma evidente perda de substrato, podendo a LãP8 ter consumido mais de 40% da proteína de soja fornecida, o que foge à intenção desse estudo pois, é preciso que o microrganismo reduza essas proteínas solúveis em peptídeos e aminoácidos sem consumir excessivamente, baixando o rendimento de produção dos hidrolisados proteicos de soja.

Na avaliação qualitativa por SDS-PAGE dos peptídeos gerados foi possível observar comparando as amostras ao controle negativo, que o excessivo acúmulo de bandas que migravam aproximadamente entre 30 a 200 kDa, reduziu drasticamente após a fermentação,

indicando um grande potencial proteolítico destas cepas do gênero *Bacillus*. Foram observadas bandas visualmente fracas migrando a 97, 66, 50, 45, 31 e 21kDa, aproximadamente. Tais bandas pertinentes em quase todas as amostras podem representar não apenas hidrolisados e sim, as próprias enzimas microbianas produzidas, afinal, enzimas são proteínas com atividade catalítica. Também há a possibilidade de serem proteínas da soja algumas dessas cepas não conseguiram degradar. Romangnolo, Polan e Barbeau (1990), Aguirre, Garro e Giori (2008) e Colugnati (2003) identificaram bandas das principais proteínas de soja (β -conglucina e glicina) migrando em 66 a 67 kDa as subunidades α' e α e, a subunidade β migrando por volta de 55 a 45 kDa. A subunidade ácida da glicina migra aproximadamente a 35 kDa enquanto a subunidade básica migra a 20-21 kDa. Quando comparadas as bandas dos hidrolisados proteicos de soja deste estudo, observa-se que as bandas que migraram a 45 kDa e a 21 kDa em todas as cepas *Bacillus sp.* e *Bacillus subtilis*, podem indicar a presença das subunidades ácidas e básicas da glicina. Chi e Cho (2016) através de seus estudos em fermentação sólida de proteína de soja, reportaram uma excelente hidrólise proteica pelo *Bacillus amiloliquefaciens*, que degradou a maior parte do conteúdo proteico da soja, contendo apenas bandas migrando de 25 kDa a menos 10 kDa. De acordo com estudos de Aguirre, Garro e Giori (2008) e Aguirre *et al.* (2014), cepas diferentes de lactobacilos utilizando proteína de soja como substrato, degradavam em sua maioria a proteína β -conglucina e suas subunidades α' e α , alguns tendo preferência a subunidade α . Em relação à degradação da glicina, algumas espécies como *L. paracasei*, foram capazes de hidrolisar tanto as subunidades ácidas como básicas enquanto outras degradaram apenas a subunidade ácida. O estudo de Aguirre, Garro e Giori (2008) demonstrou que as frações básicas foram as menos degradadas (13%) assim como podemos observar em nosso estudo a subunidade básica sendo provavelmente representada pela massa molecular de 21 kDa, a banda que mais prevalece, levando a crer que o gênero *Bacillus* também possui certa dificuldade em degradar determinada subunidade, seja por especificidade da enzima, seja pela estrutura da molécula proteica que, de acordo com Barac *et al.* (2006), é compacta e estabilizada por pontes dissulfeto além de interações hidrofóbicas e eletrostáticas.

As amostras que apresentaram maiores concentrações de peptídeos solúveis (EL07, PP3 e AMR) foram escolhidas para análise em espectrometria de massa (MALDI-TOF) para mensurar assertivamente as massas moleculares dos peptídeos gerados. O intuito dessa técnica foi detectar massas moleculares abaixo de 10 kDa, pois as proteínas utilizadas em produtos capilares necessitam ter maior penetração fibra capilar, logo, elas precisam estar reduzidas a peptídeos de baixa massa molecular. Todas as amostras apresentaram peptídeos de baixa massa moleculares (até 2 kDa), o que indicou uma eficiente hidrólise quando comparadas as massas

moleculares do controle negativo. Gibbs *et al.* (2004) descreveram a atividade de diferentes enzimas em diferentes alimentos derivados da soja por espectrometria de massa. Analisando os hidrolisados obtidos da hidrólise de tempeh por proteases provenientes de plasma bovino, foi possível observar peptídeos de 600 a 900 Da, sendo peptídeos derivados da glicinina representados por massas em tamanhos de 616, 722 e 785 Da. A hidrólise da proteína de soja por *Bacillus* aparentou ser eficiente quanto a produção de hidrolisados de baixa massa para futura aplicação em formulações para cuidados capilares. Villa *et al.* (2013) demonstraram a capacidade da espécie *Bacillus subtilis* de degradar a queratina proveniente de penas de frango. A hidrólise por fermentação submersa gerou peptídeos de massas em torno de 819 a 2500 Da e, ao serem aplicados em mechas, foi possível observar uma deposição desses hidrolisados nas fibras capilares, melhorando o aspecto das mesmas. Levando essas informações em consideração, os peptídeos de proteína de soja gerados por *Bacillus* sp. EL07, *Bacillus subtilis* AMR e *Bacillus subtilis* PP3, que apresentaram massas igualmente baixas, possuem uma potencial eficiência na deposição e reconstrução das fibras capilares. No entanto, mais estudos precisaram ser realizados para determinar as melhores condições de produção para melhores rendimentos dessas cepas e para a aplicabilidade em mechas de cabelo e observações do seu efeito sobre elas.

Quanto o perfil de aminoácidos livres observáveis em cromatografia em camada fina (TLC), viu-se a presença de quase todos os 18 aminoácidos utilizados como padrão. Amostras como AMR e EL07 entre todas as amostras, aparentaram maior diversidade de aminoácidos em seus hidrolisados. A grande parte dos aminoácidos encontrados na proteína de soja (histidina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, valina, triptofano, alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína), ácido glutâmico, serina e tirosina), previamente descrito por Simas (2005), encontram-se presentes nos hidrolisados, dentre eles, o ácido glutâmico, que teve sua presença majoritária nas amostras. Para futura aplicabilidade em produtos capilares, tais hidrolisados precisam possuir os principais aminoácidos que apresentam efeitos positivos em cabelos, como cistina, serina, ácido glutâmico, arginina e glicina já descritos por Velasco *et al.* (2009) e Woodruff (2002) *apud*. Villa (2008), que compõe a queratina, principal componente da estrutura da fibra capilar. Na proteína de soja, a cistina é o aminoácido com menor teor, porém, nos hidrolisados obtidos neste estudo, pode-se observá-lo em quase metade das amostras. A serina foi observada apenas na amostra PP3, enquanto o ácido glutâmico foi observado em mais da metade das amostras. Em nenhuma amostra a foi detectada arginina por este método. O aminoácido glicina (Gly), apesar de ser um aminoácido comumente encontrado na soja, como já descrito por Simas (2005), não possível observada por limitações técnicas, porém, é provável

que tenha tal aminoácido nesses hidrolisados. Estes resultados são qualitativos, sendo necessário métodos mais apurados como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC), que além de separar os compostos proteicos contidos nos hidrolisados, quantifica e identifica os mesmos.

Uma análise quantitativa dos aminoácidos totais foi realizada pelo método de dosagem de ninidrina. As amostras neste trabalho apresentaram altas concentrações de aminoácidos onde EL07, EL05 e EL06 apresentaram as maiores concentrações. Radha, Kumar e Prakash (2007) descreveram a composição total de aminoácidos essenciais da farinha de soja, constituindo 41,18 g de aminoácido onde, individualmente, eles variam em valores de 1,34 a 17,18 g sendo os ácidos aspártico e glutâmico contendo as maiores concentrações. Desse modo, observamos que a proteína de soja tem um alto teor de aminoácidos totais sendo promissora no setor de cosméticos.

Em relação a produção das peptidases na presença de proteína de soja e sua atividade proteolítica, é possível observar que as amostras EL06, EL07 e C2 apresentaram maiores atividades proteolíticas quando comparadas a outras amostras. Mazotto *et al.* (2011) observaram a atividade proteolítica das cepas *Bacillus cereus*, *B. licheniformis* e *B. subtilis* utilizando substrato gelatina, nas mesmas condições realizadas no presente estudo. De acordo com os dados de Mazotto *et al.* (2011), a cepa *B. subtilis* obteve uma alta atividade proteolítica chegando aproximadamente a 490 U/mL. Em nosso presente estudo, a atividade de cepas *Bacillus* sp EL06 e EL07 e cepa C2 (não identificada) foram delineadas a 6000 U/mL, 5500 U/mL e 4500 U/mL, indicando uma alta atividade proteolítica em meio proteína de soja 1%. A cepa de *B. subtilis* AMR teve sua atividade determinada em torno de 1900 U/mL, apesar de ser uma atividade relativamente baixa em detrimento as outras amostras, obteve uma das maiores concentrações de proteínas solúveis. Porém, não se pode chegar a uma conclusão quando correlacionamos os substratos a atividade enzimática, pois, fatores como especificidade e atividade da enzima podem estar envolvidos, assim como o crescimento desses microrganismos e o consumo dos peptídeos gerados. Logo, é necessário que outros estudos sejam realizados para identificações de possíveis variáveis em relação a atividade enzimática e a produção de hidrolisados de proteína de soja.

A zimografia utilizando substrato gelatina também foi realizada para avaliar a presença destas peptidases extracelulares de forma qualitativa e, apontar suas respectivas massas. Todas as amostras menos a LãP8, tiveram suas atividades proteolíticas e produção de peptidases extracelulares mensuradas, sendo amostras como EL07, PP3 e AMR com um maior número de bandas. Cedrola *et al.* (2012) cultivaram cepas de *Bacillus subtilis* SLC em meio com penas a

1% e, realizou um zimograma utilizando substrato gelatina. Tanto em pH 7 como pH 8, obteve-se uma alta atividade proteolítica. Eles identificaram bandas migrando de 100 kDa a 20 kDa enquanto Mazotto *et al.* (2011) observaram bandas nessas mesmas condições migrando de 140 kDa a 15 kDa, sendo que bandas como as de 30 kDa e 50 kDa foram observadas em ambos trabalhos. Em nosso atual estudo, foram identificadas múltiplas bandas migrando de 20 a 94 kDa, sendo representadas pelas cepas *Bacillus cereus* B2, *Bacillus sp.* EL06, *Bacillus subtilis* PP3 e *Bacillus subtilis* AMR. Amostras como B3 (não identificada) e *Bacillus sp.* EL05, apresentaram além destas, bandas migrando aproximadamente a 7 kDa. Prasanth *et al.* (2016) descreveram massas moleculares de peptidases produzidas por *B. subtilis* de aproximadamente 50 kDa. As massas variam de 20-60 kDa, onde uma banda migrando a 45 kDa foi denominada como zincoprotease não caracterizada. Bandas com massa superior a 100 kDa puderam ser observadas pelas cepas Bac.B2 (não identificada), *Bacillus sp.* EL07 e C2 (não identificada). A cepa LãP8 (não identificada), não apresentou peptidases extracelulares nas condições testadas.

Tendo em vista esses resultados, as cepas de *Bacillus sp.* EL07, EL06 e AMR mostraram-se promissoras quanto a concentração de peptídeos e presença de atividade proteolítica, sendo a amostra EL07 selecionada para os próximos estudos. Será necessário um estudo de otimização de processo, verificando as principais variáveis que afetam o processo. Um ensaio proteolítico utilizando outros substratos além da gelatina para identificação de atividade proteolítica e, zimogramas submetidos a diferentes pHs, temperaturas e tempo de incubação, para avaliar a ótima condição de produção de hidrolisados de soja e de peptidases extracelulares.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos em relação a seleção de diferentes cepas *Bacillus* spp. para hidrolisar proteína de soja, pode-se concluir que:

- Das 27 cepas testadas do laboratório Bioinovar, 10 cepas produziram as maiores zonas de hidrólise em meio ágar caseína;
- As 10 cepas selecionadas para fermentação em meio de proteína de soja mostraram-se capazes de hidrolisar a proteína de soja;
- Quanto aos aminoácidos produzidos, a maioria apresentou o principal aminoácido da proteína da soja, ácido glutâmico;
- As cepas AMR, EL07 e PP3 mostraram-se as melhores cepas para a produção de hidrolisados de soja por fermentação;
- As cepas AMR, EL07 e PP3 hidrolisaram a soja a peptídeos com massa molecular inferior a 2 kDa, sendo que o *Bacillus subtilis* PP3 apresentou uma diversidade de peptídeos de baixa massa molecular;
- As amostras apresentaram alta concentração de aminoácidos totais nos hidrolisados gerados;
- Os hidrolisados produzidos pelas cepas AMR, EL07 e PP3 apresentaram potencial para aplicação em cosméticos para cuidados capilares, sendo *Bacillus subtilis* EL07 a cepa de escolha para estudos posteriores.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-Elhalem, B. T., El-Sawy, M., Gamal, R. F. e Abou-Taleb, K. A. (2015). Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. *Ann. Agr. Sci.* 60(2), 193-202.
- ABIHPEC (2016) Associação Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos Panorama do Setor 2015. Disponível em: <https://www.abihpec.org.br>. Acesso em 01 jun. 2016.
- ABIHPEC (2016) Associação Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Panorama do setor 2016. Disponível em: <https://www.abihpec.org.br>. Acesso em 23 jun. 2016.
- Aguirre, L., Garro, M. S. e de Giori, G. S. (2008). Enzymatic hydrolysis of soybean protein using lactic acid bacteria. *Food Chem.* 111(4), 976-982.
- Aguirre, L., Hebert, E. M., Garro, M. S. e de Giori, G. S. (2014). Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains on soybean proteins. *LWT-Food Sci. Technol.* 59(2), 780-785.
- Ahmadifard, N., Murueta, J. H. C., Abedian-Kenari, A., Motamedzadegan, A. e Jamali, H. (2016). Comparison the effect of three commercial enzymes for enzymatic hydrolysis of two substrates (rice bran protein concentrate and soy-been protein) with SDS-PAGE. *J. Food Sci. Tech.* 53(2), 1279-1284.
- Arshad, Z. I. M., Amid, A., Yusof, F., Jaswir, I., Ahmad, K. e Loke, S. P. (2014). Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. *Appl. Microbiol. Biot.* 98(17), 7283-7297.
- Asgher, M., Asad, M. J., Rahman, S. U. e Legge, R. L. (2007). A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *J. Food Eng.* 79 (3), 950-955.
- Barac, M. B., Jovanovic, S. T., Stanojevic, S. P. e Pesic, M. B. (2006). Effect of limited hydrolysis on traditional soy protein concentrate. *Sensors* 6(9), 1087-1101.
- Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Marks Jr, J. G., Shank, R. C. e Snyder, P. W. (2015). Safety Assessment of Soy Proteins and Peptides as Used in Cosmetics. *Cosmetic Ingredient Review*.
- Biesebeke, R., Ruijter, G., Rahardjo, Y.S.P., Hoogschagen, M.J., Heerikhuisen, M. e Levin, A. (2002) *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations Progress report on a multi-disciplinary project. *FEMS Yeast Res.* (2), 245-8.
- Brandão, A. S. P., Rezende, G. C. D. e Marques, R. W. D. C. (2006). Crescimento agrícola no período 1999/2004: a explosão da soja e da pecuária bovina e seu impacto sobre o meio ambiente. *Economia Aplicada* 10(2), 249-266.
- Cedrola, S. M. L., de Melo, A. C. N., Mazotto, A. M., Lins, U., Zingali, R. B., Rosado, A. S., Peixoto, R.S. e Vermelho, A. B. (2012). Keratinases and sulfide from *Bacillus subtilis* SLC to recycle feather waste. *World J. Microb. Biot.* 28(3), 1259-1269.
- Chi, C. H. e Cho, S. J. (2016). Improvement of bioactivity of soybean meal by solid-state fermentation with *Bacillus amyloliquefaciens* versus *Lactobacillus spp.* and *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 619-625.
- Colugnati, P. G. (2003). Propriedades físicas e funcionais de aglomerados a base de proteína de soja. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Coscueta, E. R., Amorim, M. M., Voss, G. B., Nerli, B. B., Picó, G. A. e Pintado, M. E. (2016). Bioactive properties of peptides obtained from Argentinian defatted soy flour protein by Corolase PP hydrolysis. *Food Chem.* 198, 36-44.

Damaso, M.C.T. e Couri, S. Ageitec. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. *Árvore do Conhecimento Tecnologia de Alimentos: Fermentação*. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em 24 out. 2016.

Felix, C.R., Noronha, E.F. e De Marco, J.L. (2014). Proteases: Características e Aplicações Industriais. Em: *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Said, S. e Suraia Said e Pietro, R.C.L.R., eds, 2. ed. (Ribeirão Preto: Legis Summa), pp. 189-201.

Gehrke, C.W., Wall, L.L., Absheer, J.S., Kaiser, F.E e Zumwalt, R.W. (1985). Sample preparation for chromatography of amino acids: acid hydrolysis of proteins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68 (5), 811-821.

Gibbs, B. F., Zougman, A., Masse, R. e Mulligan, C. (2004). Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Res. Int.* 37(2), 123-131.

Glicose (2016). Proteína da soja: Conheça os benefícios da proteína isolada de soja e como ela pode ser melhor eu outras proteínas. Glicose, Rio de Janeiro, 12 dez. 2014. Disponível em: <<http://glicose.com.br/proteina-isolada-de-soja/>>

Gomes, E., Guez, M. A. U., Martin, N. e da Silva, R. (2007). Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Quim. Nova* 30(1), 136.

Grozeva, L., Tchobanov, B. e Aleksieva, P. (1994). Production of Casein Hydrolysates During the Cultivation of *Humicola Lutea* Cells, Producing Acid Proteinases. *Biotechnol. Biotec. Eq.* 8(1), 81-84.

Grunwald, P. (2015). Biocatalysts: Global Market, Industrial Applications, Aspects of Biotransformation Design, and Societal Challenges. In: *Industrial Biocatalysis*. Grunwald, P., ed. (Pan Stanford Publishing Pte. Ltd. Electronic Resource), pp.1-25.

Haki, G. D. e Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technol.* 89(1), 17-34.

Heussen, C. e Dowdle, E. B. (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical biochemistry*, 102 (1), 196-202.

Heux, S., Meynial-Salles, I., O'Donohue, M. J. e Dumon, C. (2015). White biotechnology: state of the art strategies for the development of biocatalysts for biorefining. *Biotechnol. Adv.* 33 (8), 1653-1670.

Horan, F.E. (1974). Soy protein products and their production. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 51(1), 67A-73A.

Hwang, M. N. e Ederer, G. M. (1975). Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B *streptococci*. *J. Clin. Microbiol.* 1(1), 114-115.

INHPPC (2016). Portal de Inovação em Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Disponível em: <<http://www.portalinovacaohppc.com/Web/Institucional/Portal>>. Acesso em 10 nov. 2016.

InsectBiotech Co., Ltd. Industrial enzymes: Proteases Arazyme. Disponível em: <<http://www.insectbiotech.co.kr/>>. Acesso em 04 dez. 2016.

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

Josephine, F. S., Ramya, V. S., Devi, N., Ganapa, S. B., Siddalingeshwara, K. G., Venugopal, N. e Vishwanatha, T. (2012). Isolation, production and characterization of protease from *Bacillus* sp. isolated from soil sample. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 2(1), 163-168.

Laemmli, V.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

- Lee, Y. K., Ko, B. B., Davaatseren, M. e Hong, G. P. (2016). Effects of Soy Protein Hydrolysates Prepared by Varying Subcritical Media on the Physicochemical Properties of Pork Patties. *Korean J. Food Sci. An. R.* 36(1), 8-13.
- Li, Q., Yi, L., Marek, P., Iverson, B. L. (2013). Commercial proteases: present and future. *FEBS Lett.* 587 (8), 1155-1163.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. e Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1), 267-275.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H. e Stah, D.A. (2016). Diversidade Microbiana. Em: *Microbiologia de Brock*. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H. e Stah, D.A., eds, 14. ed. (Porto Alegre: Artmed. Recurso eletrônico), pp. 502.
- Mazotto, A. M., Coelho, R. R. R., Cedrola, S. M. L., de Lima, M. F., Couri, S., de Souza, E.P. e Vermelho, A. B. (2011). Keratinase production by three *Bacillus* spp. using feather meal and whole feather as substrate in a submerged fermentation. *Enzyme research.*
- Mazotto, A. M., Couri, S., Damaso, M. C. e Vermelho, A. B. (2013). Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: comparison of submerged and solid-state fermentation. *Int. Biodeter. Biodegr.* 85, 189-195.
- Mazotto, A. M., Lage Cedrola, S. M., Lins, U., Rosado, A. S., Silva, K. T., Chaves, J. Q., Rabinovitch, L., Zingali, R.B. e Vermelho, A. B. (2010). Keratinolytic activity of *Bacillus subtilis* AMR using human hair. *Lett. Appl. Microbiol.* 50(1), 89-96.
- Mazotto, A.M. (2008). Uso de queratinases para obtenção de peptídeos para ração animal. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 193 f.
- Meyer, H. (1957). The ninhydrin reaction and its analytical applications. *Biochem. J.*67(2), 333.
- NC-IUBMB (2016) Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. Acesso em 20 jun. 2016.
- Novozymes (2015). Report application of industrial enzymes in the market. Disponível em: <http://report2015.novozymes.com/>>. Acesso 04 dez. 2016.
- Oshimura E. (2013). Hair and amino acids. *Cosmet. Toiletries, Science applied.*
- Packianathan, N. e Kandasamy, R. (2011). Skin Care with Herbal Exfoliants. *Funct. Plant Sci. Biotech.* 5(1), 94-97.
- Pera, L.M., Baigori, M.D., Pandey, A. e Castro, G.R. (2015). Biocatalysis. In: *Industrial Biorefineries & White Biotechnology*. Pandey, A., Hofer, R., Larroche, C. e Taherzadeh, M., Nampoothiri, M., eds. Elsevier. ISBN: 978-0-444-63453-5, pp. 391-408.
- Portal da Legislação (2016). Lei nº6.360/1976. Disponível em: <https://legislacao.planalto.gov.br>. Acesso em 20 nov. 2016.
- Prasanth, M., Marathe, N., Jadhav, S., Slathia, S., Ramankannan, A., Shanthini, T. e Ramesh, N. (2016). Potential of *Bacillus subtilis* to produce acidic protease under mutagenic condition. *Int. J. Pure App. Biosci.* 4(1), 126-132.
- Radha, C., Kumar, P. R. e Prakash, V. (2008). Preparation and characterization of a protein hydrolysate from an oilseed flour mixture. *Food Chem.* 106 (3), 1166-1174.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. e Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspect of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol R* (62), 597-635.

- Rawlings, N. D. (2007). An introduction to peptidases and the MEROPS database. In: Industrial Enzymes. Rawlings, N. D., Morton, F. R. e Barrett, A. J., eds. (Springer Netherlands), pp. 161-179.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J. e Bateman, A. (2011). Asparagine Peptide Lyases a seventh catalytic type of proteolytic enzymes. *J. Biol. Chem.* 286 (44), 38321-38328.
- Romagnolo, D., Polan, C. E. e Barbeau, W. E. (1990). Degradability of soybean meal protein fractions as determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.* 73(9), 2379-2385.
- Rosa, A. M., Claviso, J., Passos, L. M. L. e Aguiar, C. L. (2009). Alimentos fermentados à base de soja (*Glycine max* (Merrill) L.): importância econômica, impacto na saúde e efeitos associados às isoflavonas e seus açúcares. *Revista Brasileira de Biociências*, 7(4).
- Saini, R., Mittal, A. e Rathi, V. (2016). Formulation and in-vitro antioxidante analysis of anti-ageing cream of carica papaya fruit extract. *Indian J. Drugs*4(1), 8-14.
- Sajna, K.V., Gottumukkala, L.D., Sukumaran, R.K. e Pandey, A. (2015). White Biotechnology Cosmetics. In: Industrial Biorefineries & White Biotechnology. Pandey, A., Hofer, R., Larroche, C. e Taherzadeh, M., Nampoothiri, M., eds. Elsevier. ISBN: 978-0-444-63453-5, pp. 607-652.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G. e Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochem.* 40(8), 2689-2694.
- Sanghvi, G., Patel, H., Vaishnav, D., Oza, T., Dave, G., Kunjadia, P. e Sheth, N. (2016). A novel alkaline keratinase from *Bacillus subtilis* DP1 with potential utility in cosmetic formulation. *Int. J. Biol. Macromol.* 87, 256-262.
- Santos, S. F. M., de Souza, R. L. A., Alcântara, S. R., Pinto, G. A. S., da Silva, F. L. H. e de Macedo, G. R. (2008). Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido do pedúnculo do caju. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.10, n.2 (Campina Grande), pp.101-109.
- Schallmeyer, M., Singh, A. e Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50 (1), 1-17.
- Schultz, T.M. e Tran, T.H. US Patente 20050008604A1 (2005). Sollae LLC, 2005.
- Ścibisz, M., Arct, J. e Pytkowska, K.. (2008). Hydrolysed proteins in cosmetics production. *SÖFW-Journal Wydanie Polskie*, 1, 3-2008.
- Sharma, A. K., Sharma, V., Saxena, J., Yadav, B., Alam, A. e Prakash, A. (2015). Isolation and Screening of Extracellular Protease Enzyme from Bacterial and Fungal Isolates of Soil. *Int. J. Sci. Res. Environ. Sci.* 3(9), 0334-0340.
- Simas, R. (2005). Determinação de proteína bruta e aminoácidos em farelo de soja por espectroscopia de infravermelho próximo. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 119 f.
- Simionato, A. V. C., Carrilho, E. e Tavares, M. F. M. (2011). Characterization of protein hydrolysates of cosmetic use by CE-MS. *Journal of separation science*, 34 (8), 947-956.
- Sindayikengera, S. e Xia, W. (2006). Nutritional evaluation of caseins and whey proteins and their hydrolysates from Protamex. *J. Zhejiang Univ-Sc B* 7(2), 90-98.
- Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., Patel, A. K., Larroche, C. e Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microb. Tech.* 46(7), 541-549.

Singhania, R.R., Patel, A.K., Thomas L., Goswami, M., Giri, B.S. e Pandey, A. (2015). Industrial Enzymes. In: Industrial Biorefineries & White Biotechnology. Pandey, A., Hofer, R., Larroche, C. e Taherzadeh, M., Nampoothiri, M., eds. Elsevier. ISBN: 978-0-444-63453-5, pp. 473-497.

Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 90, 1-11.

TMF (2016). Fertilizantes inteligentes. Safra 2016/17: Soja avança com cenários distintos. Disponível em: <<http://tmffertilizantes.com.br/>>. Acesso 01 dez. 2016.

Velasco, M. V. R., Dias, T. C. D. S., Freitas, A. Z. D., Júnior, N. D. V., Pinto, C. A. S. D. O., Kaneko, T. M. e Baby, A. R. (2009). Hair fiber characteristics and methods to evaluate hair physical and mechanical properties. *Braz. J. Pharm. Sci.* 45(1), 153-162.

Vermelho, A. B. (2014). Queratinases. Em: *Enzimas como Agentes Biotecnológicos*. Said, S. e Suraia Said e Pietro, R.C.L.R., eds, 2. ed. (Rio de Janeiro: Legis Summa), pp. 212-214.

Vermelho, A.B., Villa, A.L.V., Mazotto, A.M., Dias, E.P.S. e dos Santos, E.P. US Patente 20100196302 A1(2010).

Villa, A. L. V., Aragão, M. R. S., dos Santos, E. P., Mazotto, A. M., Zingali, R. B., de Souza, E. P. e Vermelho, A. B. (2013). Feather keratin hydrolysates obtained from microbial keratinases: effect on hair fiber. *BMC biotechnology*, 13 (1), 1.

Villa, A.L.V. (2008). Produção e aplicação de peptídeos de hidrolisado de penas de frango na cosmética capilar. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 119 f.