



# BIOTRANSFORMAÇÃO DE PROTEÍNAS DE INSETOS POR MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS PARA PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS

**Palavras-Chave:** insetos, probióticos, peptídeos bioativos.

**Autores:** Ariel Vinicius F. F. Fahl; Francielle M. de Matos; Letícia N. Cruz; Vívian T. Andrade  
Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro [FEA/UNICAMP].

## INTRODUÇÃO:

Atualmente os insetos apresentam-se como uma fonte emergente de proteínas. Além da sua criação ser vantajosa em relação a outras fontes de alimentos tradicionais (aves, bovinos e suínos), por exigir menos recursos naturais e gerar menor impacto ambiental, os insetos são uma excelente fonte de proteínas<sup>1</sup>, mostrando-se como importantes substratos para produção de peptídeos bioativos.

Peptídeos bioativos são definidos como frações de proteínas com efeitos benéficos sobre o organismo ou sistemas nos quais sejam incorporados, podendo apresentar atividade antioxidante, por exemplo<sup>2</sup>. Um dos processos explorados para obtenção desses peptídeos é a fermentação microbiana, que pode resultar na produção de outros metabólitos benéficos e a possibilidade de se obter um carreador de micro-organismos probióticos<sup>3</sup>.

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a utilização de grilo-preto (*Gryllus assimilis*) como fonte proteica para produção de peptídeos bioativos com propriedades antioxidantes por meio de fermentação submersa utilizando a levedura probiótica (*Saccharomyces boulardii*).

## METODOLOGIA:

As amostras de grilo-preto fornecidas pela empresa Agrin Criação e Comércio de Insetos LTDA (Avaré, São Paulo) foram utilizadas para obtenção do concentrado proteico utilizado como substrato na fermentação. Para a fermentação utilizou-se a cultura comercial do micro-organismo probiótico *Saccharomyces boulardii*. Após a ativação da cultura e preparação do pré-inóculo do micro-organismo em caldo YEPD (caldo extrato de levedura, peptona, dextrose), as fermentações foram conduzidas nas seguintes condições: frascos Erlenmeyers contendo 10 mL de caldo YEPD suplementados com proteína concentrada de grilo-preto (2% m:v) e sacarose (2% m:v), inóculo inicial de  $10^6$  células mL<sup>-1</sup>, agitação de 150 rpm e temperatura de incubação de 30°C.

Durante a cinética de fermentação, o crescimento microbiano foi acompanhado por contagem de células viáveis em placa pelo método *drop plate* e os resultados foram expressos como  $\log_{10}$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ . A variação do pH também foi medida durante a fermentação.

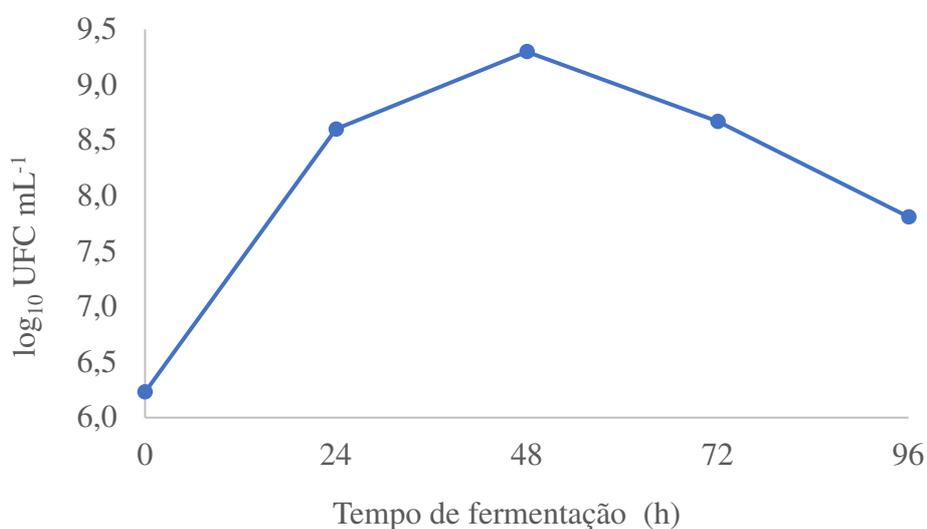
As amostras coletadas a cada 24 h durante 96 h de fermentação foram igualmente avaliadas quanto às atividades das enzimas protease e invertase ( $\text{U mL}^{-1}$ ) e da atividade antioxidante ( $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ ) utilizando os métodos ABTS e DPPH<sup>4</sup>.

Os resultados foram expressos como média ( $n = 3$ )  $\pm$  desvio padrão e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, com auxílio do software Minitab<sup>®</sup>19 de Minitab Inc. (Pensilvânia, EUA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados obtidos ao longo da fermentação realizada com a levedura *Saccharomyces boulardii*, utilizando sacarose e proteínas de grilo-preto como substratos estão representados nas Figuras 1 e 2, e Tabelas 1 e 2.

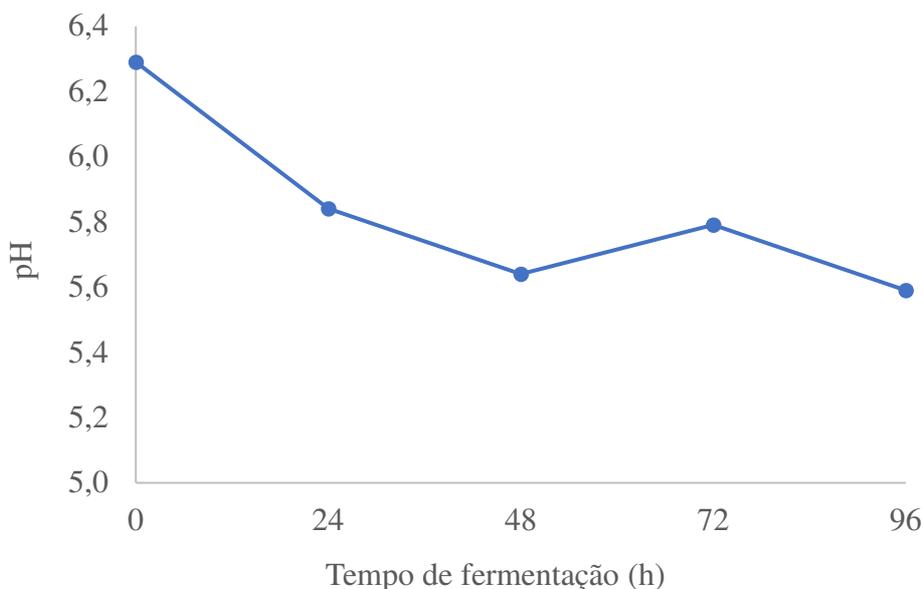
**Figura 1.** Contagem de micro-organismos ( $\log$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) no meio de cultura composto por sacarose e proteínas de grilo-preto como substratos e *S. boulardii* como agente de transformação em função do tempo de fermentação (h).



Ao analisar o perfil de crescimento celular ao longo do processo fermentativo (Figura 1), é possível identificar as fases de crescimento do micro-organismo. No entanto, não há existência da fase lag, demonstrando que a levedura já estava suficientemente ativa e adaptada ao meio. Nota-se que a taxa de crescimento é positiva até 48 h de processo, sendo maior nas primeiras 24 h, evidenciando a fase log. Nos tempos mais avançados da cinética de fermentação, após 72 e 96 h, há redução de contagem, que pode ter sido causada pelo esgotamento de nutrientes, acúmulo de metabólitos tóxicos ou outros fatores que desfavoreçam o crescimento da levedura<sup>5</sup>.

A variação do pH do meio de cultivo ao longo da fermentação (Figura 2) demonstrou uma redução nos valores deste parâmetro, que pode estar associada à produção de ácidos orgânicos pela levedura durante sua fase de crescimento<sup>6</sup>. É possível perceber também que há um leve aumento do valor de pH entre 48 e 72 h, o que pode ter ocorrido pelo a capacidade da *S. boulardii* de utilizar ácidos orgânicos como fonte de carbono<sup>7</sup>.

**Figura 2.** Variação do pH do meio de cultivo ao longo do processo fermentativo utilizando *S. boulardii* como agente de transformação e sacarose e proteínas de grilo-preto como substratos.



A Tabela 1 demonstra a atividade de invertase ao longo da fermentação, enzima responsável pela hidrólise da sacarose. A atividade máxima foi detectada nas primeiras 24 h de processo, pois tal fase representa a maior taxa de multiplicação de células e, portanto, maior consumo de substrato. Após isso, há uma redução considerável na atividade desta enzima, quando provavelmente a maior parte da sacarose do meio já havia sido hidrolisada e consumida.

**Tabela 1.** Resultados das atividades da enzima invertase durante o processo fermentativo conduzido com *S. boulardii* como agente de transformação e sacarose e proteínas de grilo-preto como substratos.

Atividade de invertase (U mL <sup>-1</sup> )	
Amostras	Atividade
24h	33,65 ± 1,49 <sup>a</sup>
48h	9,83 ± 1,77 <sup>c</sup>
72h	14,06 ± 1,13 <sup>b*</sup>
96h	13,66 ± 13,66 <sup>b*</sup>

\*Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para atividade de invertase entre os tempos de fermentação.

A atividade de protease foi medida, mas os resultados mostraram que a levedura não produziu quantidades detectáveis ao longo do processo fermentativo ou produziu as enzimas de forma endógena.

A Tabela 2 representa os resultados obtidos para atividade antioxidante (ABTS e DPPH) das amostras obtidas antes e após a fermentação, assim como para a proteína concentrada (controle). As amostras controle (não fermentadas) apresentaram alta atividade antioxidante devido à presença de moléculas com propriedades antioxidantes, como peptídeos de baixa massa molecular e polifenóis naturalmente presentes no substrato<sup>8</sup>.

**Tabela 2.** Atividades antioxidantes ( $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ ) obtidas para as metodologias de ABTS e DPPH para as amostras fermentadas por *S. boulardii*.

Amostras	ABTS	Variacoo (%)	DPPH	Variacoo (%)
Controle	895,30 $\pm$ 26,30 <sup>a</sup>	-	191,30 $\pm$ 22,70 <sup>ab</sup>	-
0h	830,37 $\pm$ 15,56 <sup>b</sup>	- 7%	157,44 $\pm$ 12,92 <sup>b*</sup>	- 18%
24h	754,00 $\pm$ 25,60 <sup>c*</sup>	- 16%	179,60 $\pm$ 21,60 <sup>b*</sup>	- 6%
48h	751,11 $\pm$ 3,20 <sup>c*</sup>	- 16%	205,00 $\pm$ 10,49 <sup>ab</sup>	7%
72h	770,10 $\pm$ 21,10 <sup>c</sup>	- 14%	242,20 $\pm$ 26,80 <sup>a</sup>	27%
96h	714,20 $\pm$ 27,90 <sup>c</sup>	- 20%	211,20 $\pm$ 20,70 <sup>ab</sup>	10%

\*Resultados do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferena significativa de atividade antioxidante entre os tempos de fermentacoo da amostra.

Para atividade antioxidante medida pelo método ABTS, observou-se decréscimo dos valores a partir das 24 h, provavelmente por conta do consumo dos peptídeos (inicialmente presentes) como fonte de nitrogênio. Para o método DPPH, diferentemente do ABTS, a maior atividade foi detectada após 72 h de fermentacoo, atingindo 242,20  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ , valor que não diferiu estatisticamente ( $p > 0,05$ ) daqueles observados nas amostras correspondentes a 48 e 96 h de fermentacoo. Essa divergência entre os resultados de atividade antioxidante  justificada pois cada método possui um mecanismo de medida distinto; enquanto no método DPPH, a capacidade de transferência de ins H  avaliada, no método ABTS, a capacidade de transferência de elétrons  o principal caminho para mensurar a capacidade antioxidante de uma molécula.

Diante dos resultados obtidos, foi possível associar os parâmetros avaliados anteriormente. Na fase inicial de crescimento ocorre as maiores taxas de multiplicacoo de células e de atividade de invertase, pois há maior consumo de substrato. As altas taxas de crescimento também desencadearam a queda do valor de pH devido  produoo de outros metabólitos, como ácidos orgânicos. No período em que há reduoo no crescimento celular, também houve reduoo da atividade de invertase e observou-se aumento na formaoo de peptídeos antioxidantes, em especial com capacidade de transferência de ins H (método DPPH).

Linhagens de *S. boulardii* são capazes de sintetizar diferentes enzimas como sacarase, maltase, trealase, fosfatases, metaloproteases e aminopeptidases. As duas últimas, em especial, que são classificadas como enzimas proteolíticas, são de grande importância para esse processo, uma vez que a ação destas enzimas resultaria na hidrólise das proteínas de grilo-preto e liberação de peptídeos bioativos. No entanto, a tentativa de quantificação desta enzima mostrou que a levedura não produziu níveis detectáveis da mesma ao longo da fermentação, como reportado na seção anterior. A não produção de proteases em níveis detectáveis pode ser um indicativo da dificuldade da linhagem de *S. boulardii* em hidrolisar as proteínas de grilo-preto nas condições de cultivo aplicadas, prejudicando assim também a geração de peptídeos bioativos em grandes quantidades.

## CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos sugerem que a fermentação utilizando a proteína concentrada de grilo-preto como substrato e o micro-organismo *Saccharomyces boulardii* resultou em um produto com altas contagens de células viáveis e propriedades antioxidantes. No entanto, estudos adicionais devem ser realizados no sentido de verificar a influência de outros parâmetros de processo que estimulem a produção de peptídeos bioativos com diferentes mecanismos de ação.

## BIBLIOGRAFIA

1. IMATHIU, S. Benefits and food safety concerns associated with consumption of edible insects. **NFS Journal**, v. 18, p. 1–11, 2020.
2. LIU, L. et al. Safety considerations on food protein-derived bioactive peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 96, p. 199–207, 2020.
3. DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. **Food Research International**, v. 74, p. 185–198, 2015.
4. AL-DUAIS, M. et al. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: Use of different assays. **European Food Research and Technology**, v. 228, p. 813-821, 2009.
5. TORTORA, G.J. et al. Microbiologia. **Artmed**. Porto Alegre, 6, p. 827, 2000.
6. PAULA et al. Technological features of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* for potential probiotic wheat beer development. **LWT**, v. 135, a. 110233, 2021.
7. MULLER, J. L. Cultivo de *Saccharomyces boulardii* em Biorreator tipo Air- Lift e em Frascos Agitados Mecanicamente. **Dissertação**. UNIVALI. Itajaí, p. 532-533, 2006.
8. KEWUYEMI, Y.O., KESA, H., CHINMA, C.E., ADEBO, O.A. Fermented edible insects for promoting food security in Africa. **Insects**. 11, 283, 2020.