



ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DE CASEÍNA

NAIARA J. CLERICI^{1,2}, ANDRÉIA M. LERMEN³, DANIEL J. DAROIT^{2,4,*}

1 Introdução

Proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas e peptídeos, constituindo um dos mais importantes grupos de enzimas industriais. Embora possam ser obtidas a partir de animais e vegetais, as principais fontes destas enzimas são microrganismos, devido aos elevados rendimentos enzimáticos alcançados durante cultivos realizados em espaços e períodos reduzidos (AGUILAR; SATO, 2018).

A hidrólise enzimática, por meio de proteases, representa uma forma efetiva de produzir peptídeos bioativos a partir de proteínas. Estes peptídeos são inativos enquanto parte da proteína precursora, demonstrando potenciais bioatividades somente após sua liberação. Hidrolisados proteicos com atividades antioxidantes podem levar ao desenvolvimento de produtos relevantes à saúde e qualidade alimentar. Especial interesse é dedicado à hidrólise das caseínas, principais proteínas do leite nas perspectivas quantitativa e nutricional (POWER; JAKEMAN; FITZGERALD, 2013).

As bioatividades dos hidrolisados são afetadas, majoritariamente, pelo substrato proteico e pela protease utilizada. Logo, a diversidade bioquímica e catalítica das proteases microbianas é uma útil ferramenta na obtenção de hidrolisados proteicos bioativos (AGUILAR; SATO, 2018).

2 Objetivos

Produzir e aplicar a protease extracelular de *Bacillus* sp. CL33A na obtenção de hidrolisados de caseína (HC) e verificar os potenciais antioxidantes destes hidrolisados.

3 Metodologia

A produção de protease foi realizada através de cultivos de *Bacillus* sp. CL33A em meio mineral (K_2HPO_4 , 0,3 g/L; KH_2PO_4 , 0,4 g/L; NaCl, 0,5 g/L) contendo farinha de penas (FP; 10 g/L), pH 7,0. Durante os cultivos (30 °C, 125 rpm, por até 7 dias), amostras foram centrifugadas (10.000 g, 10 min) e os sobrenadantes avaliados quanto à atividade proteolítica, usando azocaseína (10 g/L) como substrato em ensaios realizados a 50 °C, pH 8,0, por 30 min. Para a produção dos HC, suspensões

1 Graduanda do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *campus* Cerro Largo, Bolsista PROBIC-FAPERGS. Contato: naiaraj.clerici@gmail.com.

2 Grupo de Pesquisa: Biociências (UFFS).

3 Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis, PPGATS/UFFS, *campus* Cerro Largo.

4 Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, UFFS, *campus* Cerro Largo, Orientador.

* Contato: daniel.daroit@uffs.edu.br



de caseína (5 g/L) foram preparadas em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0). A protease (~220 U/mL) foi adicionada em dois volumes (2% v/v = HC2; 4% v/v = HC4) com relação ao volume dos sistemas reacionais (50 mL). Durante as hidrólises, realizadas a 50 °C, amostras foram retiradas em duplicata nos tempos (t; min) t0-t360. As hidrólises foram encerradas (100 °C, 15 min) e, após centrifugação (10.000 g, 20 min), os sobrenadantes corresponderam aos HC. A concentração de proteínas solúveis nos HC foi determinada pelo método Folin-fenol. As capacidades antioxidantes foram mensuradas pela captura dos radicais 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), determinadas pela diminuição da absorbância (Abs) a 734 e 517 nm, respectivamente. A quelação de Fe²⁺ foi avaliada pelo método da ferrozina (Abs a 562 nm) e o poder redutor pela habilidade em reduzir Fe³⁺ (Abs a 700 nm).

4 Resultados e Discussão

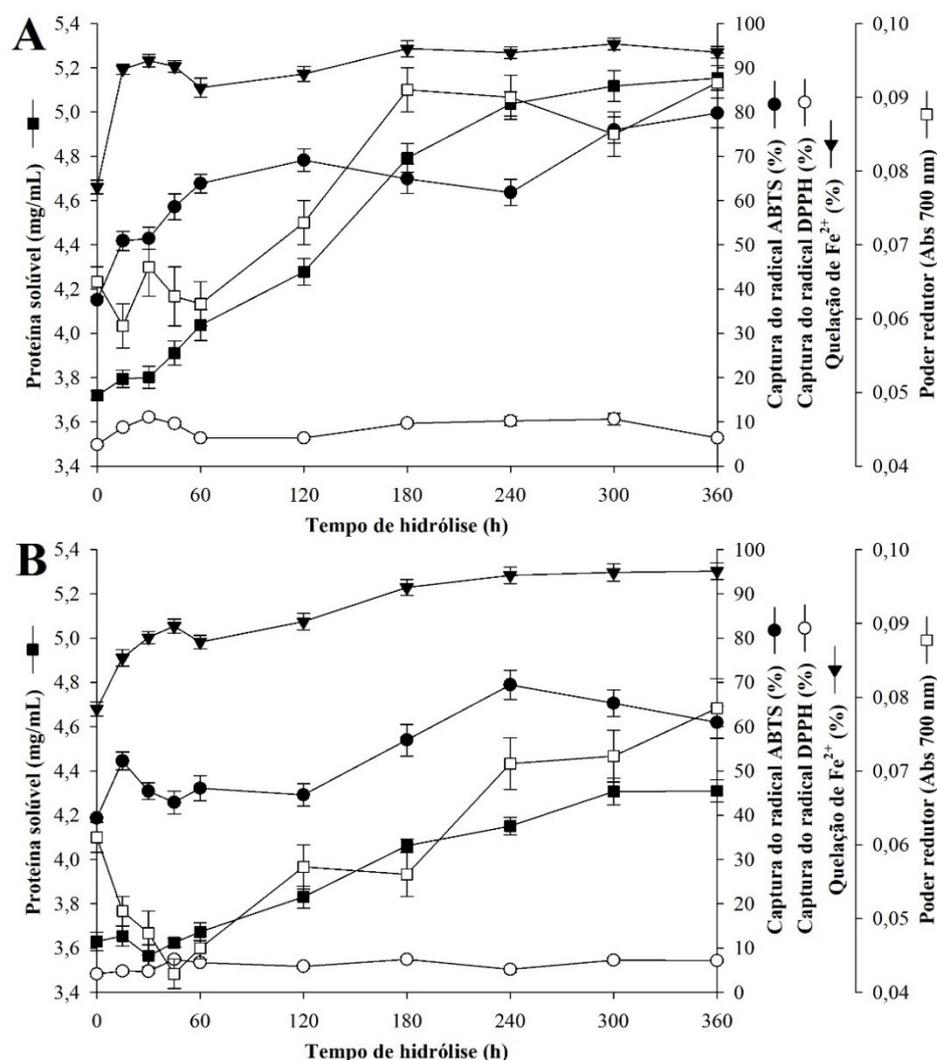
Bacillus sp. CL33A produziu proteases durante cultivos em meio contendo FP como substrato orgânico (não mostrado). O pico de atividade proteolítica (220 U/mL) ocorreu no 2º dia de cultivo, decrescendo e mantendo-se em níveis estáveis (170-195 U/mL) nas avaliações subsequentes.

A protease coletada no 2º dia de cultivo foi usada na produção de HC. Observou-se elevação na concentração de proteínas solúveis em ambos os sistemas reacionais (HC2 e HC4), indicativa da hidrólise do substrato e liberação de peptídeos (Fig. 1). Após t30, as concentrações foram superiores nos HC4 (Fig. 1A), possível reflexo da maior relação enzima/substrato nestes experimentos. No intervalo t240-t360, os conteúdos de proteínas solúveis nos HC4 e HC2 alcançaram 5,03-5,15 mg/mL (Fig. 1A) e 3,01-3,13 mg/mL (Fig. 1B), respectivamente.

Os HC exibiram potencial superior de estabilização de radicais ABTS em comparação à caseína não hidrolisada (t0), como também observado durante a hidrólise de caseína por quatro proteases comerciais (OH et al., 2013). Os HC4 obtidos aos t120, t300 e t360 exibiram 69%, 76% e 80% de captura, respectivamente (Fig. 1A), enquanto que a maior capacidade de estabilização do radical ABTS pelos HC2 foi detectada no t240 (69%; Fig. 1B).

O efeito da hidrólise sobre a captura de radicais DPPH foi limitado (Fig. 1). HC4 obtidos em t15-t45 e t180-t300 demonstraram captura de 9-11%, em relação ao t0 (~4,8%; Fig. 1A). Nos HC2, capturas ainda menores foram detectadas (Fig. 1B). Resultados análogos foram reportados para HC obtidos com a protease de *Bacillus* sp. P7 (CORRÊA et al., 2011). Contudo, a hidrólise da caseína por proteases distintas ocasionou evidentes elevações na captura do radical DPPH (OH et al., 2013).

Figura 1. Concentração de proteína solúvel e atividades antioxidantes de hidrolisados de caseína (HC) produzidos com a protease de *Bacillus* sp. CL33A. (A) HC4; (B) HC2.



A hidrólise enzimática foi benéfica para a quelação de Fe²⁺. Esta capacidade indica a ação dos HC como antioxidantes indiretos pois, ao indisponibilizar Fe²⁺, restringem a atuação destes íons na formação de radicais hidroxila. Enquanto em t₀ a quelação foi de aproximadamente 63%, os HC4 exibiram 90-91% de quelação em t₁₅-t₄₅, e 93-95% de quelação em t₁₈₀-t₃₆₀ (Fig. 1A). A atividade quelante dos HC2 foi inferior àquela dos HC4 até t₁₂₀; contudo, esta capacidade apresentou-se similar entre HC2 e HC4 em hidrólises realizadas por t₁₈₀-t₃₆₀ (Fig. 1B).

O ensaio de poder redutor indica a habilidade de moléculas antioxidantes em doar elétrons. Em comparação ao t₀, observou-se diminuição do poder redutor nos HC2 obtidos em t₁₅-t₁₈₀ (Fig. 1B) e ausência de efeito nos HC4 obtidos em t₁₅-t₁₂₀ (Fig. 1A). Embora o poder redutor tenha sido elevado nos períodos subsequentes, a contribuição da hidrólise foi restrita (Fig. 1).

Corrêa et al. (2011) indicaram aumento do poder redutor, e ausência de efeito sobre a capacidade quelante, em HC obtidos com uma protease bacteriana. Já a hidrólise de caseína pela protease de *Bacillus* sp. P45 elevou a quelação de Fe²⁺ e o poder redutor (HIDALGO et al., 2015). Tais



resultados reiteram a influência do biocatalisador, visto que sua especificidade define os tipos de peptídeos liberados (POWER; JAKEMAN; FITZGERALD, 2013), ressaltando a relevância da prospecção de enzimas na produção de hidrolisados proteicos bioativos (AGUILAR; SATO, 2018). Ainda, os resultados obtidos (Fig. 1) indicam que as propriedades bioativas dos HC não estão necessária e diretamente relacionadas ao conteúdo de proteínas solúveis. De fato, as bioatividades dos hidrolisados estão associadas às propriedades dos peptídeos neles contidos (POWER; JAKEMAN; FITZGERALD, 2013). Além da liberação de peptídeos inativos a partir de uma proteína, mesmo os peptídeos antioxidantes podem ser hidrolisados a formas inativas e vice-versa, demonstrando o caráter dinâmico do processo hidrolítico e a importância de fatores como a relação enzima/substrato e o tempo de hidrólise na obtenção de hidrolisados com as propriedades desejadas.

5 Conclusão

A protease de *Bacillus* sp. CL33A foi capaz de hidrolisar caseína. Os HC exibiram captura de radicais ABTS e quelação de Fe^{2+} superiores àquelas da caseína não hidrolisada. De modo geral, HC4 obtidos aos t300 demonstraram os mais elevados potenciais antioxidantes.

Referências

- AGUILAR, J. G. S.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018.
- CORRÊA, A. P. F. et al. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2247-2254, 2011.
- HIDALGO, M. E. et al. Biological and physicochemical properties of bovine sodium caseinate hydrolysates obtained by a bacterial protease preparation. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 510-520, 2015.
- OH, N. S. et al. The dual effects of Maillard reaction and enzymatic hydrolysis on the antioxidant activity of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 4899-4911, 2013.
- POWER, O.; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R. J. Antioxidative peptides: Enzymatic production, *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. **Amino Acids**, v. 44, p. 797-820, 2013.

Palavras-chave: proteínas do leite; protease; hidrólise; biocatálise; bioatividade.

Financiamento

FAPERGS (Bolsa de Iniciação Científica - PROBIC).