

PRODUÇÃO DE PROTEASE POR *BACILLUS* SP. CL33A E SEU USO NA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS ANTIOXIDANTES DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA *

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

1 INTRODUÇÃO

Enzimas microbianas são empregadas em diversos setores industriais. Particularmente, proteases são aplicadas em indústrias de detergentes, couros, alimentos, dentre outras. Dada a significância das enzimas proteolíticas, há constante busca por microrganismos capazes de produzi-las. Bactérias do gênero *Bacillus* são as mais importantes fontes destas enzimas (GIMENES et al., 2021).

Proteases vêm sendo avaliadas na hidrólise de proteínas alimentares, visto que este processo pode resultar na liberação de peptídeos bioativos. Dentre as bioatividades reportadas para hidrolisados proteicos, a capacidade antioxidante é uma das mais investigadas, fato embasado nos efeitos nocivos de reações de oxidação em sistemas biológicos e alimentares (AGUILAR e SATO, 2018).

As atividades biológicas dos hidrolisados dependem dos peptídeos liberados; logo, tanto a proteína a ser hidrolisada quanto as proteases determinam as bioatividades. Torna-se relevante a prospecção de proteases não comerciais na obtenção de hidrolisados antioxidantes (AGUILAR e SATO, 2018).

As proteínas da soja são amplamente usadas em alimentos devido ao seu valor nutricional e propriedades tecnológicas. Ademais, a importância das proteínas da soja vem se expandindo, pois representam uma fonte promissora de hidrolisados e peptídeos bioativos (SINGH et al., 2014).

2 OBJETIVOS

Objetivou-se (i) avaliar a produção de protease por *Bacillus* sp. CL33A durante cultivos com diferentes substratos orgânicos, (ii) usar a protease na hidrólise de proteína isolada de soja (PIS), e (iii) caracterizar a capacidade antioxidante *in vitro* dos hidrolisados proteicos obtidos.

1 Graduanda do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *campus* Cerro Largo, 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**.

* Subprojeto de vinculação: “Produção de proteases microbianas e sua aplicação na obtenção de hidrolisados proteicos com atividade antioxidante” (PES-2020-0264).

§ Contato: daniel.daroit@uffs.edu.br.

3 METODOLOGIA

A produção de proteases por *Bacillus* sp. CL33A ocorreu em cultivos submersos com os substratos peptona, caseína, PIS, proteína de soro de leite (WPI), penas de frango, farinha de penas (FP), caldo infusão cérebro coração (BHI), e caldo triptona de soja (TSB). Os substratos (10 g/L) foram adicionados a meio mineral (K_2HPO_4 , 0,3 g/L; KH_2PO_4 , 0,4 g/L; NaCl, 0,5 g/L) e, após ajuste do pH (7,5), os meios foram autoclavados (121 °C, 15 min). Os meios foram inoculados em duplicata e então incubados [30 °C, 125 rpm, 0-7 dias (d)]. A cada 24 h, alíquotas (500 µL) foram amostradas, centrifugadas e os sobrenadantes coletados. A atividade proteolítica nos sobrenadantes (protease bruta) foi mensurada usando azocaseína (10 g/L) em ensaios realizados a 50 °C, pH 8,0, por 15 min.

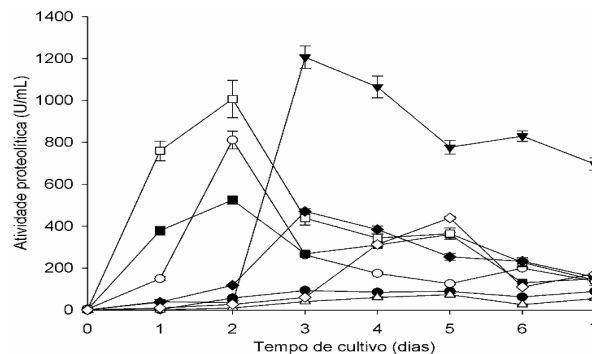
As proteases brutas dos cultivos (meios PIS e BHI) foram usadas na produção de hidrolisados de PIS (HP), denominados HPP e HPB, respectivamente. A PIS (10 g/L) foi preparada em tampão Tris-HCl (50 mM; pH 8,0) e, após pré-incubação (50 °C, 10 min), adicionou-se a protease (2%, v/v). As hidrólises ocorreram a 50 °C por até 360 min e finalizadas por fervura (100 °C, 15 min). Após resfriamento e centrifugação, os sobrenadantes (HP) foram coletados para análises subsequentes.

O teor de proteínas solúveis nos HP foi mensurada pelo método Folin-fenol. O potencial antioxidante foi determinado pela/pelo: (i) captura do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), avaliada pela absorbância (Abs) a 734 nm; (ii) captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), determinada pela Abs a 517 nm; (iii) quelação de Fe^{2+} (método da ferrozina; Abs a 562 nm); e (iv) poder redutor (redução do ferricianeto de potássio; Abs a 700 nm).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de proteases por *Bacillus* sp. CL33A nos diferentes meios é apresentada na Fig. 1.

Figura 1. Produção de proteases por *Bacillus* sp. CL33A com diferentes substratos orgânicos: caseína (Δ), WPI (\bullet), penas (\diamond), farinha de penas (\blacklozenge), TSB (\blacksquare), peptona (\circ), BHI (\square), PIS (\blacktriangledown).



As menores produções ocorreram com WPI e caseína (72-93 U/mL). FP e penas sustentaram maior produção, alcançando 470 U/mL (3 d) e 440 U/mL (5 d), respectivamente. Cultivos em peptona, TSB e BHI (2 d) resultaram em produção de proteases de 810, 524, e 1.006 U/mL, respectivamente. A maior produção de proteases ocorreu no meio PIS (1.206 U/mL, 3 d; Fig. 1). Quedas nas atividades ocorreram nos cultivos após o pico ter sido atingido, sugerindo a exaustão dos substratos e/ou processos autolíticos. A produção de proteases foi afetada pelos substratos fornecidos, indicando a relevância destas avaliações para bioprocessos (GIMENES et al., 2021). Além do rendimento enzimático, os custos dos meios também devem ser considerados, pois afetam os custos de produção. Meios comerciais, como o BHI, são onerosos quando comparados à PIS (SILVEIRA et al., 2013). Assim, a PIS representa um interessante substrato para a produção de proteases.

As proteases obtidas dos meios PIS (3 d) e BHI (2 d) foram capazes de hidrolisar a PIS, o que é indicado pela elevação do teor de proteínas solúveis durante as incubações (Fig. 2a). Maiores taxas de hidrólise ocorreram até os 60 min, diminuindo subsequentemente. Isto é usualmente observado durante a hidrólise enzimática de proteínas, como resultado da diminuição do número de ligações peptídicas hidrolisáveis, da competição entre peptídeos e proteínas nativas pelos sítios ativos das enzimas, e mesmo da desnaturação parcial das enzimas (LERMEN et al., 2020). Concentrações superiores de proteínas solúveis foram mensuradas nos HPP (Fig. 2a), o que pode derivar da maior atividade da protease produzida no meio PIS (Fig. 1). Ainda, proteases mais adequadas à hidrólise da PIS podem ter sido produzidas; contudo, tal observação merece estudos subsequentes.

Os resultados de inativação do radical ABTS pelos HP são apresentados na Fig. 2b. Observou-se que a PIS não hidrolisada exerceu atividade antioxidante (~42%). No entanto, a hidrólise da PIS incrementou a captura do radical ABTS, indicando a liberação de peptídeos com a habilidade de doar elétrons, sendo assim capazes de estabilizar o radical ABTS (ALAM et al., 2013).

Particularmente, os HPP obtidos após 3-6 h de hidrólise demonstraram capacidade de captura de 84-88% (Fig. 2b). Nos HPB, atividades inferiores aos HPP foram mensuradas no período de 1-4 h. Cita-se o potencial efeito da atividade enzimática inicial (maior nos HPP) como fator de influência.

Os HPP (30-60 min) demonstraram capacidade superior de inativação do radical DPPH (~14%) quando comparada à PIS não hidrolisada (2%; Fig. 2c). Nos HPB, os incrementos na captura foram menos proeminentes. Os resultados observados com os HPP reforçam a presença de peptídeos capazes de doar elétrons e inativar o radical DPPH (LERMEN et al., 2020).

A hidrólise não afetou o poder redutor nos HPB, exceção feita àqueles obtidos após 2 e 4 h de hidrólise (Fig. 2d). Em contrapartida, o poder redutor nos HPP foi superior em comparação à capacidade inicial, especialmente naqueles obtidos após 3-5 h (Fig. 2d). A elevação do poder redutor sugere a presença de peptídeos capazes de reduzir compostos intermediários oxidados contribuintes para a peroxidação lipídica (ALAM et al., 2013).

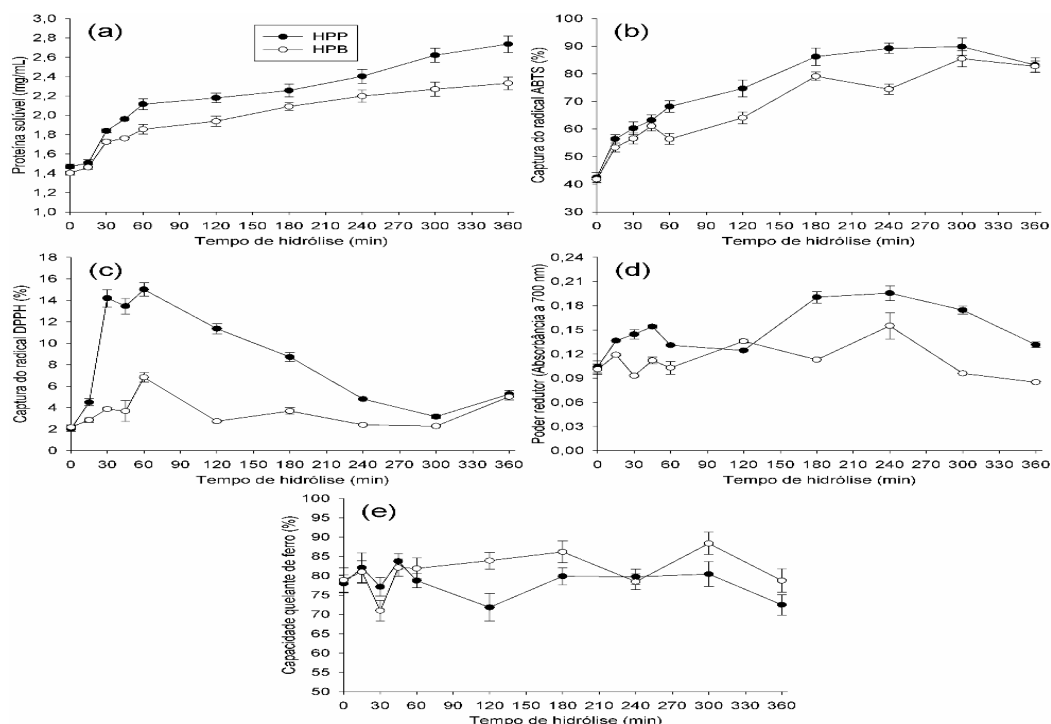


Figura 2. Conteúdo de proteínas solúveis e atividades antioxidantes nos HP. (a) Concentração de proteínas solúveis; (b) Captura do radical ABTS; (c) Captura o radical DPPH; (d) Poder redutor; (e) Capacidade quelante de Fe²⁺. Os HP foram produzidos com as proteases brutas de *Bacillus* sp. CL33A obtidas durante cultivos em meio PIS (HPP; ●) e em meio BHI (HPB, ○).

Os resultados de quelação dos íons pró-oxidantes Fe^{2+} pelos HPP (72-83%) indica que não houve efeito da hidrólise em relação à quelação inicial (78%); tendência similar ocorreu nos HPBs, exceção feita às hidrólises realizadas por 3 e 5 h, onde quelações superiores foram detectadas (Fig. 2e). Mesmo que, via de regra, a hidrólise não tenha elevado o poder redutor e a quelação de Fe^{2+} , a manutenção destas capacidades durante as hidrólises é considerada como aspecto desejável na perspectiva das bioatividades de hidrolisados proteicos (LERMEN et al., 2020).

5 CONCLUSÃO

Bacillus sp. CL33A produziu proteases usando diferentes substratos, sendo que as produções mais elevadas ocorreram em meio BHI e PIS. As proteases produzidas foram capazes de hidrolisar a PIS. O potencial antioxidante dos HP relacionou-se especialmente à inativação de radicais. Os resultados apresentam-se potencialmente relevantes considerando as escassas informações quanto ao uso de proteases microbianas não comerciais na produção de hidrolisados bioativos de proteínas da soja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ALAM, M.N. et al. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143-152, 2013.
- GIMENES, N.C. et al. An overview of proteases: production, downstream processes and industrial applications. **Separation & Purification Reviews**, v. 50, p. 223-243, 2021.
- LERMEN, A.M. et al. Biochemical properties of a partially purified protease from *Bacillus* sp. CL18 and its use to obtain bioactive soy protein hydrolysates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 192, p. 643-664, 2020.
- SILVEIRA, S.T. et al. Stability modeling of red pigments produced by *Monascus purpureus* in submerged cultivations with sugarcane bagasse. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 1007-1014, 2013.
- SINGH, B.P. et al. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v. 54, p. 171-179, 2014.

Palavras-chave: enzima; biocatálise; proteína; hidrólise; bioatividade

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2020-0264

Financiamento: UFFS