



PRODUÇÃO DE PROTEASE BACTERIANA E SUA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA

LAÍS ANDRESSA FINKLER^{1,2,*}, NAIARA JACINTA CLERICI³, ANDRÉIA MONIQUE LERMEN⁴, DANIEL JONER DAROIT^{2,5}

1 Introdução

A bioconversão microbiana é uma estratégia promissora para o manejo de penas de frango pois, além da degradação, pode resultar em produtos relevantes à biotecnologia, como enzimas proteolíticas. Proteases, enzimas que hidrolisam proteínas e peptídeos, são amplamente usadas em indústrias de alimentos (Brandelli et al., 2010).

A proteína isolada de soja (PIS) é usada como ingrediente em produtos alimentícios. Além do valor nutricional, apresenta propriedades funcionais adequadas para a produção de alimentos como carnes processadas, bebidas, fórmulas infantis, entre outros (Nishinari et al., 2014).

A hidrólise enzimática pode ser empregada no incremento das características tecnológicas da PIS, como solubilidade e capacidade emulsificante. Neste sentido, a prospecção de proteases pode resultar em hidrolisados proteicos com propriedades desejadas (Castro e Sato, 2014).

2 Objetivos

Este trabalho visou (i) produzir uma protease bacteriana, (ii) usar a protease na hidrólise da PIS e (iii) avaliar a solubilidade e capacidade emulsificante dos hidrolisados de PIS (HPIS).

3 Material e Métodos

Bacillus sp. CL18 foi usado para produção de protease em meio composto por (g/L): K₂HPO₄, 0,3; KH₂PO₄, 0,4; NaCl, 0,5; NH₄Cl, 1,1; peptona, 1,1; penas, 30,0. Os cultivos (30 °C, 125

1 Graduanda do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *campus* Cerro Largo, Bolsista PROBIC-FAPERGS. Contato: laisandressa26@hotmail.com.

2 Grupo de Pesquisa: Biociências.

3 Graduanda do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, UFFS, *campus* Cerro Largo.

4 Mestranda, Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis, UFFS.

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

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



rpm) foram realizados por até 7 dias. A degradação das penas foi avaliada pela redução da massa seca. Após centrifugação ($10.000 \times g$, 10 min), a atividade proteolítica (azocaseína como substrato) e proteínas solúveis (método Folin-fenol) foram avaliadas nos sobrenadantes. Sobrenadantes do tempo de cultivo com maior atividade proteolítica (3.700 U/mL) foram adicionados (4%, v/v) a suspensões de PIS [5 g/L, em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 8,0)]. A hidrólise da PIS ocorreu a 50 °C por até 6 h, sendo encerrada por fervura (15 min). Após resfriamento e centrifugação ($10.000 \times g$, 20 min), os sobrenadantes (HPIS) foram coletados. A concentração de proteínas solúveis nos HPIS foi avaliada pelo método Folin-fenol. O índice de emulsificação (E_{24}) foi verificado usando HPIS e óleo de soja (1:1). Após homogeneização em tubos, estes permaneceram estáticos (24 h) e então calculado o $E_{24} = (\text{altura da emulsão} / \text{altura da coluna de líquido}) \times 100$. A solubilidade da PIS e de HPIS obtidos aos 120 min de hidrólise foi avaliada. Os HPIS foram liofilizados, ressuspensos em água destilada (0,1 mg/mL), e o pH foi ajustado (2,0-10,0). Após agitação (30 °C, 30 min) e centrifugação ($10.000 \times g$, 15 min), as proteínas solúveis foram mensuradas sobrenadantes. A proteína total foi determinada após solubilização (0,5 N NaOH), sendo a Solubilidade (%) = (proteínas no sobrenadante / proteína total) $\times 100$. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4 Resultados e Discussão

A produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 atingiu valores máximos (3.700 U/mL) no 5º dia de cultivo. Ao mesmo tempo, a massa das penas foi reduzida em 74% e o conteúdo de proteínas solúveis foi elevado para 6,3 mg/mL (Fig. 1). Considerando a composição proteica das penas, sua degradação por microrganismos necessita de proteases extracelulares que, atuando sobre o substrato, liberam proteínas solúveis no meio (Brandelli et al., 2010).

A protease (5º dia de cultivo) foi usada na hidrólise da PIS. O aumento do conteúdo de proteínas solúveis é indicativo da hidrólise (Castro e Sato, 2014). Maior incremento de proteínas solúveis ocorreu aos 15 min, com menor liberação ao longo da hidrólise (Tabela 1).

A PIS, e HPIS obtidos após 120 min de hidrólise, foram avaliados quanto à solubilidade. A menor solubilidade da PIS em pH 4,0-5,0 (Fig. 2) coincide com seu ponto isoelétrico, o que dificulta seu uso em alimentos ácidos, como molhos para saladas. O HPIS demonstrou maior solubilidade na faixa de pH avaliada, incluindo pHs próximos ao ponto isoelétrico da PIS

(Fig. 2). Resultados similares são reportados, explicados pela liberação de peptídeos de baixa massa molecular, associada à exposição de grupos polares e ionizáveis dos aminoácidos ao meio aquoso, o que favorece a interação com moléculas de água (Meinlschmidt et al., 2016). A PIS é usada como emulsificante em alimentos como maionese e derivados da carne. Emulsões óleo/água são formadas por gotículas de óleo dispersas na fase aquosa, sendo que um emulsificante deve facilitar a formação da emulsão e prevenir a coalescência (Nishinari et al., 2014). A hidrólise resultou em tendência de aumento do E_{24} da PIS, para hidrólises realizadas por até 240 min (18,3%); em tempos maiores, quedas no E_{24} foram observadas (Tabela 1). Resultados análogos foram obtidos por Castro e Sato (2014). A hidrólise limitada aumenta a solubilidade, permitindo a difusão mais rápida dos peptídeos até a interface óleo/água. Nestes peptídeos, resíduos hidrofóbicos adsorvem às gotículas de óleo e os hidrofílicos interagem com a fase aquosa, impedindo a coalescência. Contudo, a hidrólise excessiva resulta em peptídeos menores, que podem permanecer na fase aquosa e não aderir à interface óleo/água, ou perder eficiência na redução da tensão interfacial (Horax et al., 2017).

5 Conclusão

A degradação de penas por *Bacillus* sp. CL18 resultou na produção de proteases. A protease foi capaz de hidrolisar a PIS, incrementando sua solubilidade e capacidade emulsificante.

Figura 1. Massa residual das penas (●), produção de protease (○) e concentração de proteínas solúveis (■) durante cultivos de *Bacillus* sp. CL18.

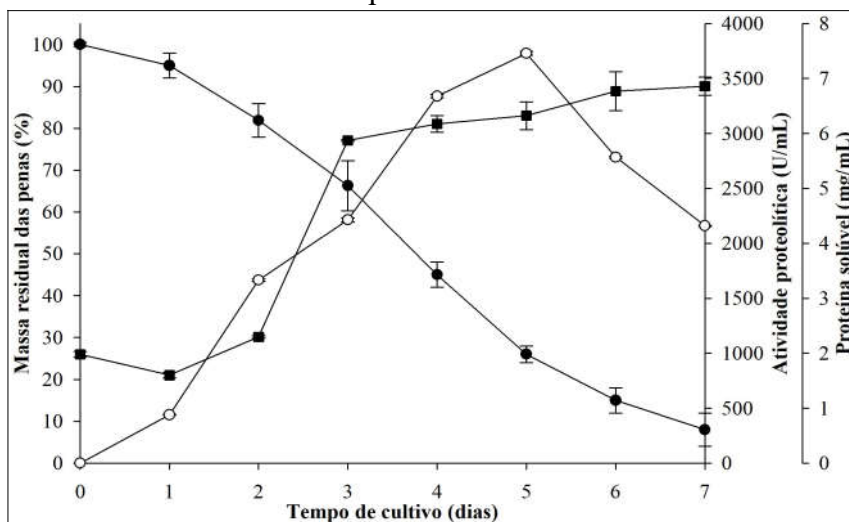
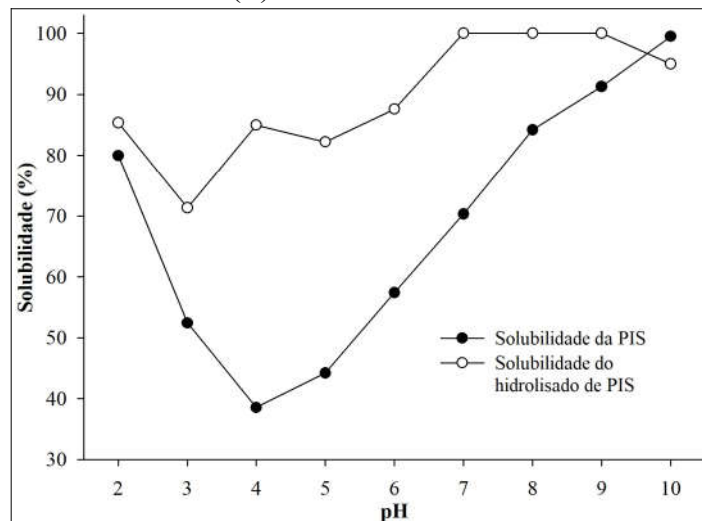


Tabela 1. Proteína solúvel e capacidade emulsificante de HPIS.

Tempo de hidrólise (min)	Proteína solúvel (mg/mL)	Índice de emulsificação (E ₂₄ , %)
0	1,766 ± 0,018	5,00 ± 0,10
15	2,223 ± 0,040	5,90 ± 0,20
30	2,275 ± 0,023	7,67 ± 0,40
60	2,292 ± 0,030	10,00 ± 0,30
120	2,373 ± 0,024	15,00 ± 0,90
180	2,418 ± 0,024	16,67 ± 0,50
240	2,494 ± 0,025	18,33 ± 0,80
300	2,522 ± 0,023	6,67 ± 0,50
360	2,557 ± 0,035	6,67 ± 0,40

Figura 2. Solubilidade da PIS (●) e de HPIS obtidos aos 120 min de hidrólise (○).



Referências

- Brandelli, A., et al. **Applied Microbiology and Biotechnology** 85, 1735-1750, 2010.
- Castro, R.J.S.; Sato, H.H. **International Journal of Food Science & Technology** 49, 317-328, 2014.
- Horax, R., et al. **International Journal of Food Science & Technology** 52, 196-204, 2017.
- Meinlschmidt, P., et al. **Food Science & Nutrition** 4, 11-23, 2016.
- Nishinari, K., et al. **Food Hydrocolloids** 39, 301-318, 2014.

Palavras-chave: proteínas alimentares; *Bacillus*; enzima; hidrolisado proteico; solubilidade.

Financiamento

CNPq (Apoio financeiro) e FAPERGS (Bolsa de Iniciação Científica - PROBIC).