

## OBTENÇÃO E APLICAÇÃO DA PROTEASE DE *BACILLUS* SP. CL14 NA PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS ANTIOXIDANTES DE CASEINATO BOVINO\*

BRUNA W. KOPPLIN<sup>1,2</sup>, BERNARDETE S. BERNARDO<sup>3</sup>, DANIEL J. DAROIT<sup>2,4,§</sup>

### 1 Introdução

Proteínas são geralmente consideradas como fontes de aminoácidos essenciais na nutrição. Tal compreensão vem sendo ampliada, pois hidrolisados proteicos podem exibir atividades biológicas, associadas aos peptídeos liberados por processos hidrolíticos. Em particular, potenciais antioxidantes podem ser relevantes para contrapor os efeitos do estresse oxidativo. As caseínas, proteínas mais importantes do leite nas perspectivas quantitativa e nutricional, são interessantes fontes de peptídeos antioxidantes, sendo a hidrólise enzimática a principal estratégia para sua liberação (POWER et al., 2013).

Proteases comerciais são comumente usadas nos processos de hidrólise. Contudo, estudos vêm sendo conduzidos acerca da produção de proteases por diferentes microrganismos. Pela ampla diversidade bioquímica e catalítica das proteases microbianas, enzimas alternativas podem ser promissoras para a produção de hidrolisados bioativos (HIDALGO et al., 2015).

### 2 Objetivos

Avaliar a produção de protease por *Bacillus* sp. CL14 em diferentes substratos, usar a protease na hidrólise de caseinato bovino (CAS), e mensurar o potencial antioxidante dos hidrolisados.

### 3 Metodologia

A produção de proteases ocorreu em Erlenmeyers (250 mL) contendo 50 mL de meio mineral (g/L: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,3; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4; NaCl, 0,5) adicionado de (10 g/L) peptona, caseína, proteína de soja (PIS), proteína de soro de queijo (WPI), penas, farinha de penas (FP), caldo infusão

1 Graduanda do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Cerro Largo, contato: brunawkopplin@gmail.com.

2 Grupo de Pesquisa: Biociências (UFFS).

3 Mestranda, PPG em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis, UFFS, Campus Cerro Largo.

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

§ Contato: daniel.daroit@uffs.edu.br.

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

cérebro coração (BHI), ou caldo triptona de soja (TSB), ajustados a pH 7,5. Os meios foram inoculados, incubados (30 °C, 125 rpm) e, a cada dia (0-7 dias), cultivos foram sacrificados (duplicatas), centrifugados, e os sobrenadantes (protease bruta) coletados. A atividade de protease foi avaliada usando azocaseína, em ensaios realizados a 60 °C, pH 9,0, por 15 min.

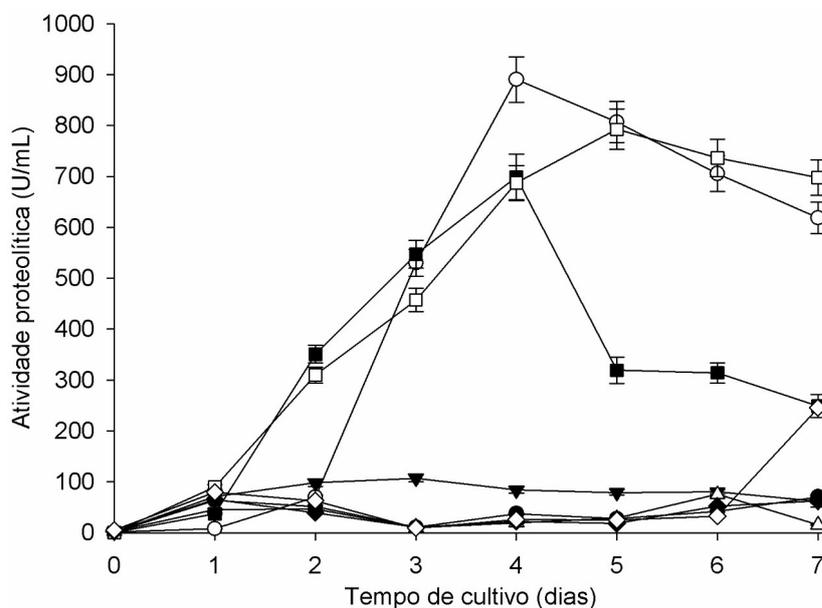
A protease bruta com maior atividade foi usada na hidrólise de CAS. O CAS (10 g/L), em tampão Tris-HCl (50 mM; pH 9,0; 5 mM Ca<sup>2+</sup>), foi pré-incubado (55 °C, 10 min) e então adicionou-se a protease (2%, v/v). As hidrólises ocorreram a 55 °C por 0-240 min e então finalizadas (100 °C, 15 min). Após centrifugação, os sobrenadantes (hidrolisados) foram avaliados quanto à concentração de proteínas solúveis (método Folin-fenol), eliminação dos radicais 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico) [ABTS; absorvância (Abs) a 734 nm] e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH; Abs a 517 nm); quelação de Fe<sup>2+</sup> (método da ferrozina; Abs a 562 nm); e poder redutor (método do ferricianeto de potássio; Abs a 700 nm).

#### 4 Resultados e Discussão

Penas, FP, WPI, caseína e PIS resultaram em baixa produção de proteases (< 110 U/mL) (Fig. 1). Penas e FP são constituídas por queratinas, proteínas insolúveis que conferem resistência a estes substratos. Embora WPI, PIS e caseína sejam proteínas solúveis, seu caráter macromolecular impede a absorção direta. Logo, o uso destes substratos depende da produção de proteases extracelulares, que hidrolisam o substrato e liberam peptídeos absorvíveis (LI et al., 2020). Assim, indica-se a incapacidade destes substratos em induzir a produção de proteases, sugerindo limitações de *Bacillus* sp. CL14 em explorá-los para crescimento.

A produção de proteases atingiu 690, 700, e 890 U/mL após 4 dias nos meios BHI, TSB, e peptonas, respectivamente (Fig. 1). As peptonas (também contidas no TSB e BHI) são misturas de peptídeos e aminoácidos, moléculas de fácil uso pelos microrganismos; TSB e BHI ainda contêm glicose. No início dos cultivos (dia 1; Fig. 1), a ampla disponibilidade de nutrientes prontamente absorvíveis, que sustenta o crescimento e a produção de energia, pode inibir a expressão dos genes codificantes para proteases. Com o uso destes nutrientes, as bactérias passam a experimentar condições de limitação nutricional, ativando a produção de proteases, que são secretadas na tentativa de adaptação ao estresse nutricional (LI et al., 2020).

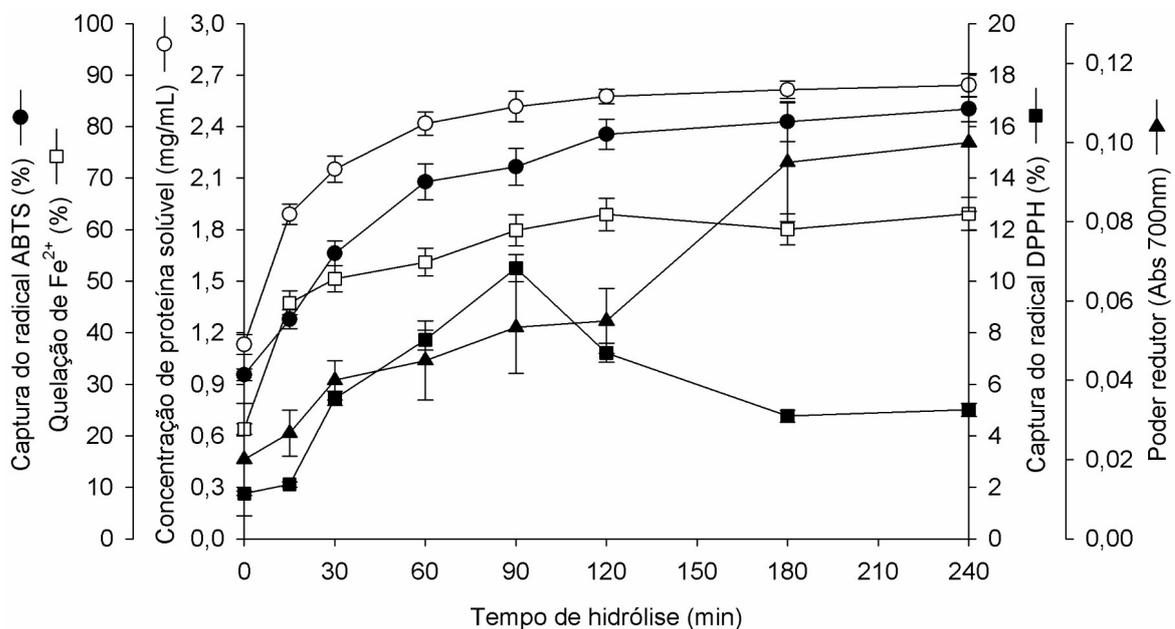
**Figura 1.** Produção de protease por *Bacillus* sp. CL14 com diferentes substratos: peptona (○), BHI (□), TSB (■), PIS (▼), caseína (△), WPI (●), penas (◇), FP (◆).



A protease produzida no meio peptona (4 dias; Fig. 1) foi usada na hidrólise de CAS. A Fig. 2 apresenta o incremento no conteúdo de proteínas solúveis, indicando a capacidade da protease em hidrolisar o CAS, liberando peptídeos de menor massa. Maiores taxas de hidrólise foram verificadas até os 60 min, diminuindo subsequentemente, sugerindo a redução do número de ligações peptídicas passíveis de hidrólise no CAS, a competição entre o CAS e produtos de hidrólise por sítios catalíticos, e até a desnaturação parcial da protease (LERMEN et al. 2020). Avaliou-se então o potencial antioxidante dos hidrolisados de CAS (Fig. 2). A captura do radical ABTS foi elevada de 31,8% (0 min) para 78,5-83,4% após 120-240 min de hidrólise. A hidrólise influenciou positivamente a eliminação do radical DPPH, com a captura inicial (1,8%; 0 min) sendo incrementada para 10,5% após 90 min (Fig. 2). Indica-se que ocorreu a liberação de peptídeos capazes de doar elétrons e estabilizar estes radicais. A diferença de captura entre ABTS e DPPH, embora possa indicar a presença de peptídeos distintos, comumente reflete diferenças na solubilidade dos radicais. O ABTS é solúvel em meios aquosos e orgânicos, mas o DPPH só é solúvel nos últimos. Os hidrolisados são soluções aquosas, e os peptídeos hidrofílicos neles contidos reagem rapidamente com o ABTS; já o DPPH pode não difundir prontamente no meio aquoso (TANG et al., 2010). A capacidade de quelação de  $Fe^{2+}$  foi elevada de 21,3% (0 min) para 60-63% após 90-240 min

de hidrólise (Fig. 2). Esta habilidade, associada aos peptídeos liberados, é considerada uma atividade antioxidante indireta pois, com a quelação de  $Fe^{2+}$ , estes íons ficam indisponíveis para catalisar a produção de radicais hidroxila, que por sua vez estão associados a danos oxidativos em seres vivos e a reações de oxidação em alimentos (LERMEN et al., 2020).

**Figura 2.** Concentração de proteínas solúveis e atividades antioxidantes de hidrolisados de CAS obtidos com a protease bruta de *Bacillus* sp. CL14.



O ensaio de poder redutor mensura a capacidade de moléculas em reduzir  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ , indicando potencial para a redução de intermediários oxidados em processos de peroxidação lipídica. A hidrólise do CAS apresentou efeito insignificante em relação ao poder redutor. Valores de 0,02-0,10 Abs a 700 nm foram detectados após 15-240 min de hidrólise, em comparação a 0,02 Abs a 700 nm para o CAS não hidrolisado (Fig. 2).

Os resultados obtidos vão ao encontro do crescente interesse acerca do uso de proteases não-comerciais na hidrólise de proteínas. Hidrolisados de CAS obtidos com a protease de *Bacillus* sp. P7 exibiram eliminação do radical ABTS, quelação de  $Fe^{2+}$  e poder redutor (HIDALGO et al., 2015). A hidrólise de caseína com a protease de *Streptomyces gedanensis* incrementou a captura de radicais e o poder redutor (RAHULAN et al., 2012), e a hidrólise de CAS bovino e caprino por uma protease de *Acremonium* sp. afetou positivamente a capacidade de captura de radicais e a quelação de  $Fe^{2+}$  (NASCIMENTO et al., 2021).

## 5 Conclusão

O substrato peptona (10 g/L) sustentou a maior produção de protease por *Bacillus* sp. CL14. A protease foi capaz de hidrolisar CAS. Atividades antioxidantes mais elevadas, verificadas pela eliminação de radicais e quelação de Fe<sup>2+</sup>, foram observadas após 90-120 min de hidrólise.

## Referências Bibliográficas

- 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.
- 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, 643–664, 2020.
- LI, Y. et al. Ultrasonic modification on fermentation characteristics of *Bacillus* varieties: Impact on protease activity, peptide content and its correlation coefficient. **LWT**, v. 154, 112852, 2022.
- NASCIMENTO, T. C. E. S. et al. Antarctic fungus proteases generate bioactive peptides from caseinate. **Food Research International**, v. 139, 109944, 2021.
- POWER, O. et al. 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.
- RAHULAN, R. et al. Aminopeptidase from *Streptomyces gedanensis* as a useful tool for protein hydrolysate preparations with improved functional properties. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 7, p. 791–797, 2012.
- TANG, X. et al. Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 587–593, 2010.

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

**Nº de Registro no sistema Prisma:** PES-2021-0040

## Financiamento

UFFS – Apoio financeiro (PES-2020-0264) e bolsa de iniciação científica (PES-2021-0040).