

## APLICAÇÃO DE UMA PROTEASE BACTERIANA NA PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS ANTIOXIDANTES DE PROTEÍNA DE SOJA

TAINARA L. GOETTEMS<sup>1,2,\*</sup>, BERNARDETE S. BERNARDO<sup>3</sup>, GABRIELA P. MORAES<sup>4</sup>, CAROLINA B. DA SILVA<sup>4</sup>, DANIEL J. DAROIT<sup>2,5,§</sup>

### 1 Introdução

Grãos de soja são ricos em proteínas (36-56%) que, por sua elevada qualidade nutricional, vêm sendo amplamente usadas na alimentação humana e animal. Dentre os produtos obtidos a partir do processamento da soja estão os isolados proteicos ( $\geq 90\%$  de proteína), aplicados na formulação de alimentos também por suas características tecnológicas. Ainda, proteínas da soja são fontes de peptídeos moduladores de respostas fisiológicas (Singh et al., 2014).

Estes peptídeos exibem atividades biológicas somente após serem liberados das proteínas precursoras. Assim, processos microbianos e enzimáticos são intensamente investigados na hidrólise de proteínas. Tais hidrolisados podem exibir atividades antioxidantes, antimicrobianas, anti-hipertensivas, antidiabéticas, entre outras, de elevada relevância no contexto da saúde humana e mesmo da tecnologia de alimentos (Akbarian et al., 2022).

A principal estratégia para a produção de hidrolisados bioativos é a hidrólise enzimática, pela eficiência e especificidade dos biocatalisadores. Predomina o uso de proteases comerciais, obtidas especialmente de microrganismos. Contudo, a prospecção de proteases microbianas alternativas (não-comerciais) vem recebendo destaque, contribuindo para ampliar o arsenal de enzimas adequadas à geração de hidrolisados bioativos (Brandelli; Daroit, *no prelo*).

### 2 Objetivos

Obter a protease bruta de *Bacillus* sp. CL14, aplicar a protease na hidrólise de proteína

<sup>1</sup>Graduanda do Curso de Ciências Biológicas - Licenciatura, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Cerro Largo, contato: taigoetems44@gmail.com

<sup>2</sup>Grupo de Pesquisa: Biociências

<sup>3</sup> Mestre, PPG em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS), UFFS, Campus Cerro Largo.

<sup>4</sup>Mestranda, PPGATS, UFFS, Campus Cerro Largo.

<sup>5</sup>Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. UFFS, Campus Cerro Largo, **Orientador**.

§ Contato: daniel.daroit@uffs.edu.br

isolada de soja (PIS), e avaliar o potencial antioxidante dos hidrolisados produzidos.

### 3 Metodologia

A bactéria *Bacillus* sp. CL14 foi usada como fonte de proteases. Os cultivos para a produção de proteases foram realizados em Erlenmeyers (250 mL) contendo 50 mL de meio mineral ( $K_2HPO_4$ , 0,3 g/L;  $KH_2PO_4$ , 0,4 g/L; NaCl, 0,5 g/L) adicionado de peptona (10 g/L). Os meios foram autoclavados, resfriados, e então inoculados. As incubações ocorreram a 30 °C, 125 rpm. Os cultivos foram retirados em triplicatas em tempos de incubação preestabelecidos (0-5 dias), centrifugados ( $10.000 \times g$ , 20 min), e os sobrenadantes então coletados.

A atividade proteolítica nos sobrenadantes (protease bruta) foi mensurada usando azocaseína (10 g/L), em ensaios realizados a 60 °C, pH 9,0, 15 min. Uma unidade de atividade proteolítica (U) foi definida arbitrariamente como a quantidade de enzima a causar aumento de 0,1 unidade de absorvância (Abs) a 420 nm. O sobrenadante de cultivo que demonstrou a maior atividade proteolítica foi utilizado como protease bruta para a hidrólise da PIS.

Para as hidrólises, a PIS (10 g/L) foi adicionada de tampão Tris-HCl (50 mM; pH 9,0; 5 mM  $Ca^{2+}$ ) e pré-incubada (55 °C, 20 min). Adicionou-se a protease bruta (2%, v/v) e as hidrólises transcorreram a 55 °C, com agitação, por 0-240 min. As hidrólises foram finalizadas por fervura (100 °C, 20 min) em tempos (t; min) preestabelecidos (t0, t15, t30, t60, t90, t120, t180, t240 min). Após resfriamento, procedeu-se à centrifugação ( $10.000 \times g$ , 30 min).

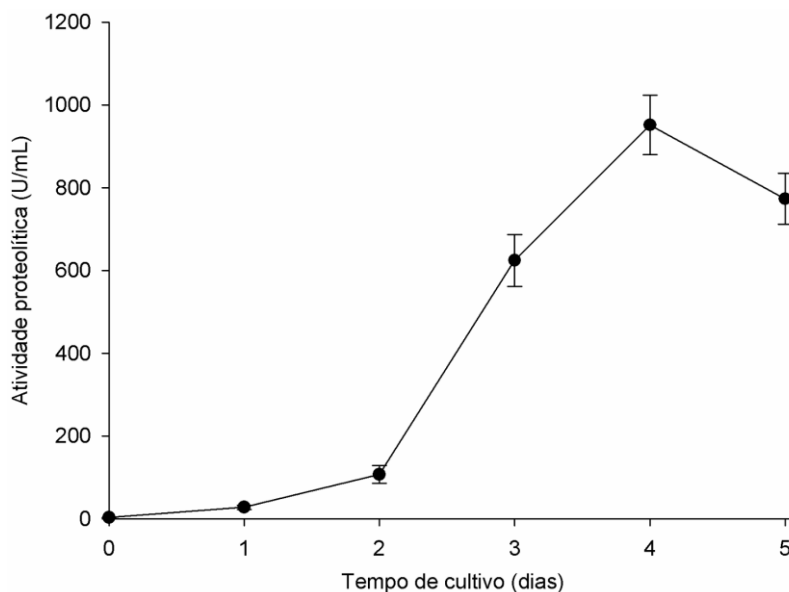
Os sobrenadantes coletados (hidrolisados de PIS), foram avaliados quanto à (i) concentração de proteínas solúveis (mg/mL), pelo método Folin-fenol; (ii) capacidade de eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), avaliada pela Abs a 517 nm (%); (iii) eliminação do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), avaliada pela Abs a 734 nm (%); (iv) quelação de  $Fe^{2+}$ , pelo método da ferrozina (Abs a 562 nm; %); e (v) poder redutor, pelo método do ferricianeto de potássio (Abs a 700 nm).

### 4 Resultados e Discussão

A produção de protease por *Bacillus* sp. CL14 no meio contendo peptona é apresentada na Fig. 1. Peptonas contêm peptídeos e aminoácidos, rapidamente usados pelos microrganismos. Contudo, a depleção dos nutrientes mais acessíveis leva os microrganismos a condições que limitam seu crescimento, e este fator pode ocasionar a expressão de genes que codificam proteases e sua secreção para o meio (Adigüzel et al., 2009). De fato, baixa produção de

proteases foi detectada até o 2º dia de cultivo. Após, a produção foi elevada, atingindo valores máximos no 4º dia (951 U/mL; Fig. 1). Esta protease bruta foi aplicada na hidrólise da PIS.

**Figura 1.** Produção de protease por *Bacillus* sp. CL14 em função do tempo de cultivo.



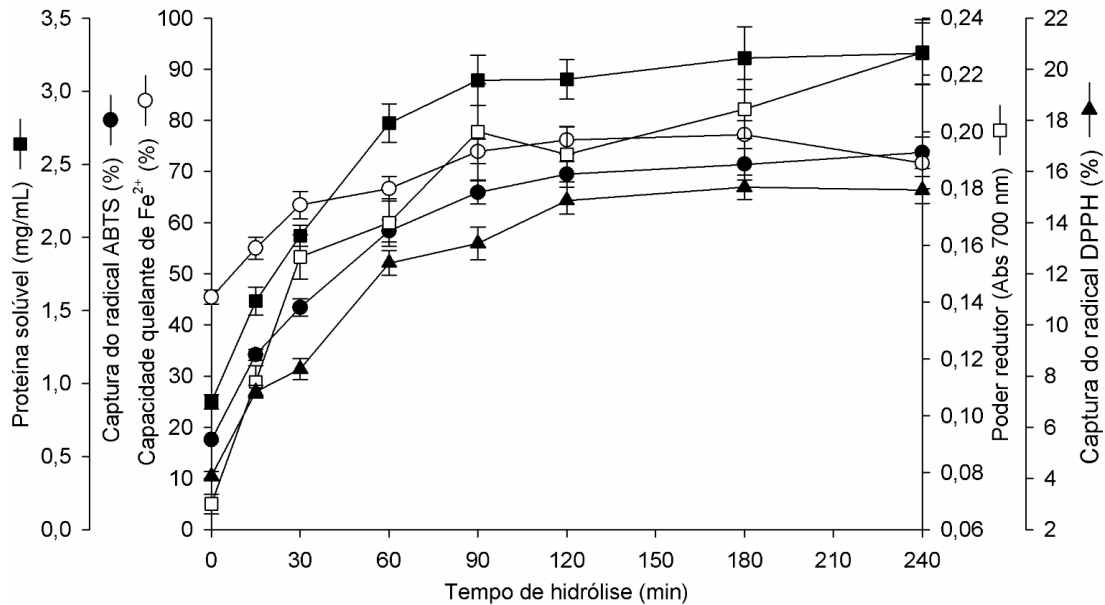
A protease bruta demonstrou habilidade de hidrolisar a PIS, como observado pelo incremento do conteúdo de proteínas solúveis ao longo da incubação (Fig. 2). A concentração inicial ( $t_0$ ; 0,87 mg/mL) foi elevada para 3,07-3,25 mg/mL em  $t_{90}$ - $t_{240}$ . Em outros termos, isso indica que houve liberação de peptídeos de menor massa a partir da PIS (Oliveira et al., 2014).

A produção de hidrolisados antioxidantes vem sendo extensamente investigada, considerando o potencial destes produtos na contraposição aos efeitos prejudiciais que reações de oxidação podem exercer na saúde humana e na qualidade de alimentos (Zhu et al., 2022). Assim, os hidrolisados obtidos foram avaliados quanto aos seus potenciais antioxidantes *in vitro*.

Como apresentado na Fig. 2, todos os indicadores de atividade antioxidante foram afetados positivamente pela hidrólise, quando comparados ao  $t_0$ . A neutralização do radical DPPH pela PIS ( $t_0$ ; 4,1%) foi elevada para ~15,2% em  $t_{120}$ - $t_{240}$  (Fig. 2). A eliminação do radical ABTS em  $t_{120}$ - $t_{240}$  atingiu ~71,5%, enquanto em  $t_0$  a neutralização foi de 17,5% (Fig. 2). O incremento da capacidade antirradical indica que peptídeos liberados a partir da PIS demonstram capacidade antioxidante por meio da transferência de elétrons (Zhu et al., 2022).

**Figura 2.** Concentração de proteínas solúveis e atividades antioxidantes em hidrolisados de PIS

produzidos com a protease bruta de *Bacillus* sp. CL14.



A quelação de Fe<sup>2+</sup> pela PIS (t0; 45,4%) foi ampliada nos hidrolisados, alcançando 71,6-77,2% em t90-t240 (Fig. 2). A quelação diminui a disponibilidade de íons Fe<sup>2+</sup>, com menor possibilidade de participarem de reações que geram radicais prejudiciais (Zhu et al., 2022).

O poder redutor dos hidrolisados de PIS também foi avaliado, pois reflete a capacidade de peptídeos em doar elétrons, indicando a redução de intermediários oxidados envolvidos, por exemplo, em processos de peroxidação de lipídios (Oliveira et al., 2014). Hidrolisados obtidos em t90-180 exibiram poder redutor de ~0,200 Abs700, atingindo 0,228 Abs700 em t240; em contrapartida, a PIS (t0) apresentou poder redutor de 0,069 Abs700 (Fig. 2).

A produção de hidrolisados antioxidantes a partir da PIS é usualmente realizada utilizando proteases disponíveis comercialmente. O uso de proteases microbianas não-comerciais para tal propósito é escasso; contudo, resultados promissores vêm sendo reportados. Por exemplo, demonstrou-se o potencial antioxidante de hidrolisados de PIS obtidos com proteases de *Aspergillus oryzae* LBA 01 e *Paenibacillus elgii* TKU051 (Brandelli; Daroit, *no prelo*). Incrementos na eliminação de radicais DPPH e ABTS, poder redutor e quelação de Fe<sup>2+</sup> foram demonstrados para hidrolisados de PIS obtidos com proteases de *Chryseobacterium* sp. kr6 (Oliveira et al., 2014) e *Chryseobacterium polytrichastri* ERM1:04 (Mukhia et al., 2021).

## 5 Conclusão

A máxima produção de proteases por *Bacillus* sp. CL14 ocorreu no 4º dia de cultivo

usando peptona (10 g/L) como substrato. A protease bruta desta linhagem bacteriana foi capaz de hidrolisar a PIS. Os hidrolisados de PIS exibiram potencial antioxidante através da capacidade de transferência de elétrons e quelação de  $Fe^{2+}$ . Nas condições de hidrólise empregadas, os melhores índices de atividade antioxidante ocorreram em t120-240.

### Referências Bibliográficas

- Adigüzel, A.C. et al. Sequential secretion of collagenolytic, elastolytic, and keratinolytic proteases in peptide-limited cultures of two *Bacillus cereus* strains isolated from wool. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 226-234, 2009.
- Akbarian, M. et al. Bioactive peptides: synthesis, sources, applications, and proposed mechanisms of action. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, 1445, 2022.
- Brandelli, A.; Daroit, D.J. Unconventional microbial proteases as promising tools for the production of bioactive protein hydrolysates. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, no prelo. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2145262>
- Mukhia, S. et al. Generation of antioxidant peptides from soy protein isolate through psychrotrophic *Chryseobacterium* sp. derived alkaline broad temperature active protease. **LWT – Food Science and Technology**, v. 143, 111152, 2021.
- Oliveira, C.F. et al. Antioxidant activity and inhibition of meat lipid oxidation by soy protein hydrolysates obtained with a microbial protease. **International Food Research Journal**, v. 21, p. 775-781, 2014.
- Singh, B.P. et al. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v. 54, p. 171-179, 2014.
- Zhu, Y. et al. Food protein-derived antioxidant peptides: molecular mechanism, stability and bioavailability. **Biomolecules**, v. 12, 1622, 2022.

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

**Nº de Registro no sistema Prisma:** PES 2022-0030

**Financiamento:** FAPERGS – PROBIC (Edital Nº 717/GR/UFGS/2022)