

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Efeito de Diferentes Condições de Reação na Hidrólise da Caseína de Leite Bovino Catalisada por Protease de *Bacillus* sp. P45

Samuel Marczewski Gonçalves¹, Joyce Thalita Francelino Vieira¹, Adriano Brandelli², Felipe da Silva Figueira¹, Cezar Augusto da Rosa¹ e Susana Juliano Kalil¹

¹Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos

Caixa Postal 474 – 96201-900 Rio Grande – RS – E-mail: samuel_m_goncalves@hotmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – 91501-970 Porto Alegre – RS

RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar, através do grau de hidrólise (GH), os efeitos de diferentes condições de temperatura, de relação enzima:substrato (E:S) e de concentração de substrato, ao longo de 8 horas, na reação de hidrólise enzimática de caseína de leite bovino, catalisada pela protease de Bacillus sp. P45. As hidrólises foram avaliadas pelo método do pH-stat. Foi verificado que todas as variáveis testadas possuem efeito significativo no GH. Dentre as temperaturas testadas, a de 55°C apresentou os menores valores de GH para 8 horas de reação, sendo que 40°C e 50°C não tiveram diferenças significativas entre si. Ao aumentar a relação E:S foi observada uma tendência no aumento do GH. Porém, o aumento da concentração de substrato demonstrou um efeito de redução do GH.

Palavras-chave: hidrólise enzimática, pH-stat, protease, *Bacillus* sp. P45, caseína

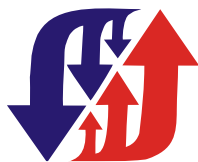
INTRODUÇÃO

As proteases são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas e, desta forma, podem gerar peptídeos fundamentais para o desenvolvimento de inúmeros processos biológicos. Sendo assim, as proteases possuem um potencial de uso, que vai da indústria alimentícia até o desenvolvimento de fármacos, entre outros. Neste contexto, o *Bacillus* sp. P45 (Número de acesso no GenBank: AY962474) é um micro-organismo, isolado do intestino do peixe Jaraqui (*Piaractus mesopotamicus*), da bacia amazônica, que se destaca por ser capaz de utilizar substratos de baixo custo e produzir proteases. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes condições de temperatura, relação enzima:substrato (E:S) e de concentração de substrato ao longo de 8 horas na reação de hidrólise enzimática de caseína de leite bovino (CLB) catalisada pela protease de *Bacillus* sp. P45.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

A azocaseína foi comercialmente adquirida da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). A CLB foi adquirida da Synth® com concentração de 90% (m/m) de proteínas. Os outros reagentes químicos empregados foram de grau analítico. A solução de CLB foi preparada através da dissolução em água destilada com o pH corrigido para 7,5 pela adição de solução de NaOH.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Aparato experimental

O sistema reacional teve o pH e a temperatura monitorados e registrados continuamente através de uma interface computacional de aquisição de dados com base na plataforma Arduino Uno®. Este sistema foi composto por dois reatores fechados, encamisados, de 100 ml, com banho de recirculação de água e com agitação magnética.

Produção e purificação da protease de *Bacillus* sp. P45

O cultivo de *Bacillus* sp. P45 foi realizado, segundo Daroit et al. (2009). O extrato enzimático bruto foi obtido pela separação do sobrenadante resultante da centrifugação do cultivo desse micro-organismo.

A protease de *Bacillus* sp. P45 foi purificada a partir de uma estratégia determinada por Sala et al. (2014) que consistiu de uma sequência de dois sistemas aquosos bifásicos (SAB) integrados ao processo de diafiltração para remoção de polietileno glicol (PEG). A enzima purificada foi liofilizada e armazenada a 4°C para utilização nas etapas posteriores.

Ensaio de hidrólise com protease de *Bacillus* sp. P45

Os ensaios de hidrólise de CLB foram realizados nas temperaturas de 40°C, 50°C e 55°C, nas relações E:S de 200 U/g de proteína, 400 U/g de proteína e 600 U/g de proteína, nas concentrações de proteína de 2,5%, 3,5% e 4,5% (m/v) e com o pH inicial de aproximadamente 7,5. Os experimentos para a avaliação dos efeitos exercidos pela temperatura, pela relação E:S e pela interação entre essas variáveis no grau de hidrólise (GH) da reação tiveram a concentração de proteína fixada em 3,5% (m/v). Os experimentos para avaliação dos efeitos exercidos pela concentração de substrato e pela interação entre concentração de substrato e relação E:S no GH da reação tiveram a temperatura fixada em 40°C.

Ao reator foram adicionados 75 ml da solução de CLB e a reação começou a ser monitorada após a adição da solução enzimática. O pH foi corrigido manualmente com o uso de solução de NaOH após meia hora de reação e a cada hora subsequente, por um total de 8 h de reação. Os volumes de base utilizados foram registrados para o cálculo do GH.

Determinação da atividade enzimática

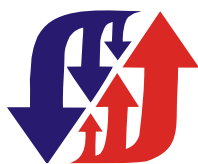
A determinação da atividade proteolítica do liofilizado contendo protease de *Bacillus* sp. P45, foi realizada conforme a metodologia descrita por Daroit et al. (2009), usando azocaseína 1% (m/v) como substrato. A transmitância da solução resultante desta metodologia foi medida a 420 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que causa a mudança de 0,1 unidades de absorvância sob condições específicas de reação.

Determinação do grau de hidrólise

O GH foi estimado pelo método do pH-stat, segundo Adler-Nissen (1986), podendo ser calculado pela combinação da Equação 1, da Equação 2 e da Equação 3.

$$\text{GH}(\%) = \frac{B N_B}{\alpha h_{\text{tot}} m_p} 100 \quad (1) \quad \alpha = \frac{10^{(\text{pH}-\text{pK})}}{1 + 10^{(\text{pH}-\text{pK})}} \quad (2) \quad \text{pK} = 7,8 + \frac{298 - T}{298 T} 2400 \quad (3)$$

Onde: B é o volume consumido de base durante a hidrólise (ml); N_B é a normalidade da base consumida durante a hidrólise; m_p é a massa de proteína do substrato proteico (g); h_{tot} é o número de ligações peptídicas (mol/kg); α é o grau de grupamentos amino liberados pela hidrólise; pH é o valor fixado para o método de pH-stat; pK é a constante de dissociação ácida do grupamento amino; e T é a temperatura da hidrólise em Kelvin.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

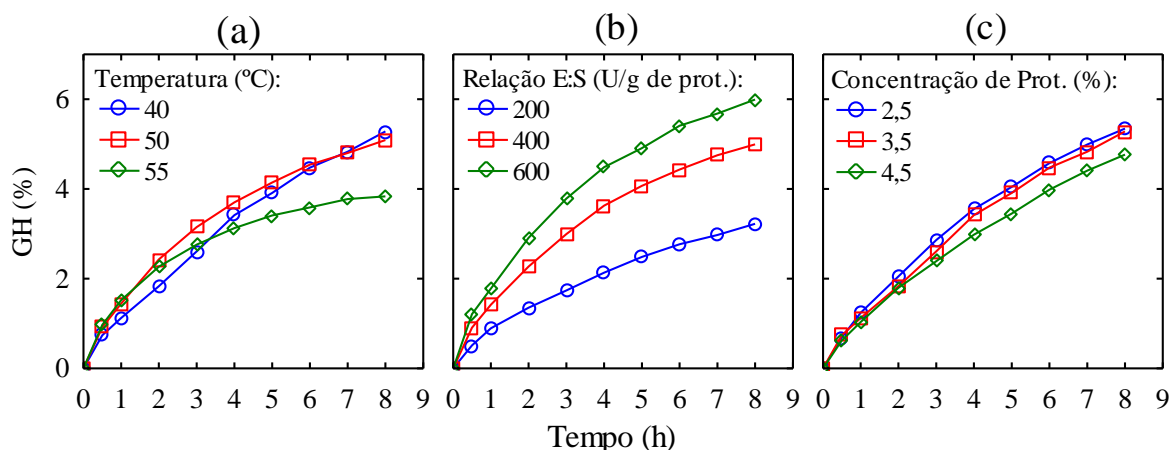
Análise estatística

Foram realizadas duas análises de variância (ANOVA) fatoriais de medidas repetidas para a avaliação dos efeitos. As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ em um nível de confiança de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Através dos experimentos com concentração de substrato fixa, foi verificado que os efeitos da temperatura, da relação E:S e de suas interações no GH são significativos. A Figura 1 (a) e a Figura 1 (b) apresentam os valores médios de GH para estes experimentos. Na Figura 1 (a) se observa que a reação a 55°C foi prejudicada. Isto se deve a desnaturação térmica da protease, conforme observado por Lemes (2015). Em seus estudos ele verificou que a meia vida da enzima a 40°C é aproximadamente 4 vezes maior do que a meia vida da enzima a 55°C. Além disso, a Figura 2 (a) demonstra que não houve diferença significativa entre os efeitos das reações a 40°C e a 50°C.

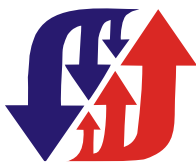
Figura 1 – Efeitos da temperatura (a), relação E:S (b) e concentração de substrato (c) no GH.



Através dos experimentos com temperatura fixa, foi verificado que houve efeito significativo da variação da concentração de proteína, porém não houve efeito significativo para a interação entre concentração de substrato e relação E:S. Sendo assim, dentro do intervalo testado, as variáveis influenciam o GH de forma independente uma da outra. Com isso, o aumento de concentração de proteínas tende a diminuir o GH e, o aumento da relação E:S deverá tende a aumentar o GH.

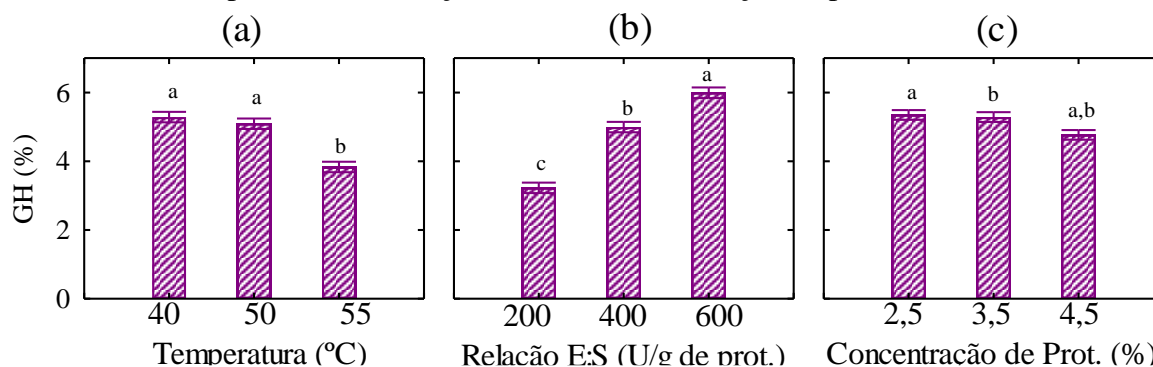
Como pode ser observado na Figura 2 (b) todas as relações E:S testadas foram estatisticamente diferentes entre si. Apesar do efeito das concentrações de proteínas de 2,5% e 4,5% não terem sido significativamente diferentes entre si, para os dados de 8 horas de reação (Figura 1 (c)), elas são significativamente diferentes quando consideramos a média de todos os tempos, devido ao maior número de amostras e consequente redução do erro experimental.

O maior valor de GH dentre todos os ensaios realizados foi de 7,4% e ocorreu para as condições de temperatura de 40°C, relação E:S de 600 U/g de prot. e 3,5% de concentração de proteína. De acordo com as avaliações dos efeitos das diferentes condições de hidrólise, a única condição inesperada foi a da concentração de substrato. Apesar deste ter sido o valor mais alto de GH encontrado nos ensaios, valores de aproximadamente 9% já foram reportados na hidrólise de caseinato bovino pelo uso desta protease (Hidalgo et al., 2012).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Figura 2 – Análise de diferença de médias dos GH na oitava hora de reação para a temperatura (a), relação E:S (b) e concentração de proteínas (c).



Média \pm desvio padrão, n = 6. Letras iguais em cada gráfico, indicam que não há diferença entre valores ($p < 0,05$).

CONCLUSÕES

A hidrólise de CLB foi significativamente influenciada por todas as variáveis independentes testadas. Apesar do efeito das temperaturas de 40°C e 50°C não terem sido significativamente diferentes entre si, o aumento para 55°C produziu um efeito negativo, devido a desnaturação térmica da protease. Contudo, o aumento da relação E:S demonstrou um efeito positivo no GH, podendo ser considerado o mais significativo dentre os efeitos testados, uma vez que as médias dos valores de GH dos seus fatores apresentaram as maiores diferenças e foram significativamente diferentes entre si. Por outro lado, o aumento da concentração de substrato produziu um efeito negativo no GH, sendo que as diferenças das médias dos seus fatores foram as menores dentre as variáveis independentes testadas.

Agradecimentos: FAPERGS e CNPq

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler-Nissen, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. Elsevier Applied Science Publishers, 1986. ISBN 0853343861.
- Daroit, D. J.; Corrêa, A. P. F.; Brandelli, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 358-363, 2009.
- Hidalgo, M. E. et al. Physicochemical and antioxidant properties of bovine caseinate hydrolysates obtained through microbial protease treatment. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 3, p. 342-352, 2012.
- Lemes, A. C. **Produção, caracterização e aplicação de queratinase de *Bacillus* sp. P45 na obtenção de queijo cremoso**. 2015. (Doctor). EQA, FURG
- Sala, L. et al. Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 2016-2024, 2014.