



## DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM BACTÉRIAS ATRAVÉS DE ZIMOGRAMA E ENSAIO EM PLACAS

MARIA TAMIRES MARQUES SILVA(1) - Antônio Silvío do Egito Vasconcelos(2) - Suelene Carlos Pereira(3) - Karina Olbrich dos Santos(4) - Hévila Oliveira Salles(5) - Antônio Silvío do Egito Vasconcelos(6) -

1. Discente do curso de Tecnologia em Alimentos do IFCE - Campus Sobral - 2. Pesquisador da EMBRAPA Caprinos e Ovinos - 3. Graduada em Tecnologia em alimentos e Biologia - 4. Pesquisadora da EMBRAPA Caprinos e Ovinos - 5. Pesquisadora da EMBRAPA Caprinos e Ovinos - 6. Pesquisador da EMBRAPA Caprinos e Ovinos -

### PALAVRAS-CHAVE

Bactérias Nativas, Proteases, Eletroforese, DGA.

### APOIO

EMBRAPA Caprinos e Ovinos.

### INTRODUÇÃO

A busca por produtos biodegradáveis ou que tragam benefícios ao ser humano através de alimentos, impulsionou o crescimento do emprego de enzimas na indústria. As proteases são amplamente utilizadas para provocar modificações em alimentos proteicos. A grande maioria das enzimas utilizadas industrialmente é produzida a partir de microrganismos, por processos fermentativos (Rao et al., 1998). As enzimas extracelulares são capazes de degradar nutrientes insolúveis, como celulose, proteína e amido. Estes produtos, após hidrólise, são transportados para dentro da célula, onde são usados como nutriente para o crescimento (Oh et al., 2000).

No leite, a utilização dessas enzimas pode originar a quebra de ligações peptídicas e alterações na conformação molecular das proteínas, resultando peptídeos com propriedades funcionais e tecnológicas que permitem a criação de muitos segmentos de produtos, principalmente, produtos lácteos (Rao et al., 1998).

### OBJETIVOS

Verificar a presença de atividade proteolítica em bactérias nativas, isoladas de leites e queijos da região comparando-as com bactérias comerciais, através de zimograma e difusão em gel de ágar (DGA).

### MATERIAL E MÉTODOS

As bactérias nativas foram isoladas de leites e queijos da região. Foi inoculado uma alçada de cada bactéria em 5 mL de MRS caldo e incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. Após a incubação as amostras foram centrifugadas e o pellet redissolvido em 9 mL de leite desnatado reconstituído a 10% (LDR), seguindo incubação a 37 °C por 24 h e, posteriormente, liofilização e armazenagem a 26 °C. As amostras utilizadas para obtenção dos resultados foram: LDR, LDR incubado a 37 °C por 24h, duas bactérias nativas e três bactérias comerciais (*Lactobacillus paracasei* LPC 37, *L. rhamnosus* LR 32 e *L. casei* LAC 4). Foi utilizada uma diluição de 2 mg de amostra liofilizada para 500 µL de tampão específico de cada ensaio. No zimograma seguiu-se metodologia descrita por Feitosa et al. (1998), com algumas adaptações, e utilizou-se 30 µL de amostra por poço. No teste de DGA utilizou-se ágar a 2% com 1% de gelatina, tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, 50 µL de amostra por poço de 7 mm e incubação a 37 °C por 24 h.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o tempo de incubação, os géis de eletroforese e de DGA foram corados com Azul de Coomassie R-250. Os resultados obtidos no zimograma foram verificados através da visualização de bandas proteolíticas representadas pela digestão da gelatina no gel de eletroforese, observada pela ausência de coloração nessas posições. No ensaio de DGA a atividade proteolítica das amostras foi observada pela presença de halo de hidrólise como resultado da difusão das proteases no gel. Todas as amostras bacterianas avaliadas apresentaram atividade proteolítica no zimograma e no ensaio de DGA. No entanto, o zimograma mostrou ser mais sensível para detecção da atividade nas amostras em estudo.

### CONCLUSÕES

Diante do exposto concluímos que as bactérias nativas estudadas apresentam atividade proteolítica, sendo melhor detectada através de zimograma.

### REFERÊNCIAS

- OH, Y. S.; SHIH, I. L.; TZENG, Y. M. , WANG, S. L. Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the desproteinization of shrimp and crab shell wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 27, n. 1/2, p. 3-10, July 2000.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, v. 62, n. 3, p. 597-635, Sept.1998.
- FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.Q.B.; GRANER, E.; MANGILI, O.C. Brentani, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon*; v.36, n. 7, p. 1039-1051, 1998.