



Otimização da combinação da papaína e de proteases de *Bacillus licheniformis* (Protezyne® HPF) por meio do Delineamento Composto Central

Jhennifer C. S. Alves^{1*}(PG), Elias H. Gomes¹ (PG), Adriane T. Silva¹ (PG), Willian C. Terra² (PQ), Filipe E. F. Soares¹ (PQ)

^{1*}Departamento de Química, Laboratório de Biotecnologia e Bioquímica Aplicada, UFLA, Lavras- MG. Email: jennifer.alves2@estudante.ufla.br

¹Departamento de Química, Laboratório de Biotecnologia e Bioquímica Aplicada, UFLA, Lavras- MG;

² Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Nematologia, UFLA, Lavras- MG.

RESUMO

O controle de fitopatógenos por meio de agroquímicos tornou-se um grande desafio na atualidade. Nesse contexto, o uso de enzimas como as proteases tem se mostrado uma alternativa promissora ao uso dessas substâncias, pois promovem redução dos fitopatógenos, sem causar danos ao meio ambiente e à saúde humana. Portanto, o objetivo deste estudo foi otimizar o uso combinado de papaína e de proteases de *Bacillus licheniformis* (Protezyne® HPF) utilizando metodologia de superfície de resposta. Para isso, foi utilizado o delineamento composto central (DCC).

Palavras-chave: Proteases, otimização, metodologia de superfície de resposta, controle bioquímico.

Introdução

Os fitonematóides representam uma das principais limitações para o avanço da agricultura (1, 2). Dentre os diversos gêneros que causam perdas agrícolas, destacam-se os nematóides do gênero *Meloidogyne*. Esses nematóides provocam o crescimento anormal das raízes das plantas, gerando tumores conhecidos como galhas, que afetam o crescimento e saúde do vegetal (3). O controle atual desses nematóides pode ser realizado por meio de nematicidas químicos. Entretanto, formas alternativas de controle desses fitopatógenos, visando minimizar os efeitos causados por esses nematicidas ao meio ambiente são necessárias. O uso de enzimas e microrganismos para a promoção do controle biológico e bioquímico vem ganhando destaque (4, 5, 6). Enzimas hidrolíticas, como as proteases, são capazes de participar da degradação da cutícula proteica dos nematóides, promovendo assim o controle eficiente desses fitopatógenos (7). Para melhor aplicação dessas enzimas, é importante otimizar as condições necessárias para melhor eficiência catalítica. Sendo assim, o objetivo do estudo foi otimizar, a partir do delineamento composto central (DCC) o uso combinado da papaína e de proteases de *Bacillus licheniformis*.

Experimental

Delineamento Composto Central

Cinco níveis experimentais foram definidos para cada uma das proteases, sendo: 0,120% (p/v), 0,100% (p/v), 0,055% (p/v), 0,010% (p/v) e 0,000% (p/v). Treze experimentos foram realizados, sendo 5 deles repetições do ponto central.

Obtenção das enzimas

A papaína utilizada foi obtida comercialmente e as proteases de *B. licheniformis* foram gentilmente doadas pela empresa Prozyn, como o produto comercial Protezyne® HPF. A solução das enzimas foi

preparada de acordo com as concentrações delineadas pelo método estatístico.

Atividade proteolítica

Adicionaram-se em tubos de ensaio 500 µL de solução de caseína 1% (m/v) pH 8,00 como substrato, 400 µL de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,00, e 100 µL da solução combinada das proteases, com as concentrações geradas pelo DCC. Os frascos contendo as soluções foram incubados a 60°C por 15 min em banho-maria. Para interromper a reação, 1000 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) foram adicionados aos tubos de ensaio. A solução foi então centrifugada por 10 min a 10.000 g e a absorbância do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro a 280 nm. Uma curva padrão de tirosina foi construída para a quantificação da atividade enzimática. Uma unidade de proteases foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µg de tirosina por minuto nas condições de ensaio descritas (8).

Análise estatística

Para análise estatística dos resultados obtidos, foram realizados ANOVA e teste de Tukey com níveis de significância de 5% de probabilidade (9).

Resultados e Discussão

A resposta avaliada foi a atividade das proteases testadas. A partir do delineamento fatorial, uma função foi gerada para essa resposta. Por meio dessa função, é possível obter valores de atividade proteolítica para as enzimas estudadas dentro dos níveis utilizados. A função, após eliminação dos termos das variáveis não significativas, foi:

$$\text{Atividade proteolítica (U/mL)} = 645.43 \text{ Protezyne}^{\circledR} \text{ HPF} - 3266.9 \text{ Protezyne}^{\circledR} \text{ HPF}^* 163 \text{ Protezyne}^{\circledR} \text{ HPF} + 6.4971$$



Para o estudo, apenas os termos lineares e quadráticos da variável “Concentração de Protezyn®” foram estatisticamente significativos ($p < 0,01$), como demonstrado na tabela abaixo (Tabela 1):

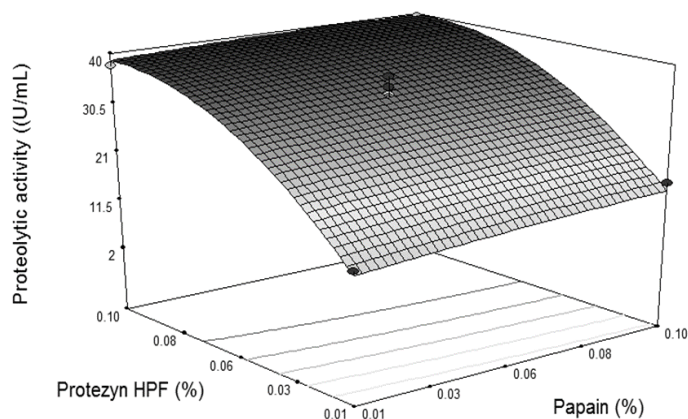
Tabela 1. Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático desenvolvido para a combinação das proteases papaína (%) e Protezyn® HPF (*Bacillus licheniformis*) (%) sobre a atividade proteolítica (U/mL).

Fonte	P>F
Constante	0.011
Papaína	0.205
Protezyn®	<0.001
Papaína*Papaína	0.540
Protezyn®*Protezyn®	<0.001
Papaína*Protezyn®	0.550

Em outras palavras, a atividade enzimática da papaína não foi significativa, nas concentrações avaliadas. Apenas a Protezyn® demonstrou atividade significativa. Isso pode ter ocorrido devido a ação catalítica da Protezyn® sobre a papaína, uma vez que as proteases agem sobre ligações peptídicas. Assim, podemos sugerir que as moléculas de papaína foram degradadas pelas proteases de *B. licheniformis*.

A superfície de resposta gerada demonstrou que quanto maior a concentração de Protezyn® HPF, maior a atividade proteolítica, como é possível observar através do modelo de superfície tridimensional gerado (Figura 1):

Figura 1. Curva de superfície de resposta da combinação de papaína e Protezyn® HPF (*Bacillus licheniformis*) sobre a atividade proteolítica (U/mL).



O modelo testado obteve coeficiente de correlação igual a 0,98, o que demonstrou sua significância. Dentro dos níveis utilizados para as variáveis (concentração de enzimas) a concentração que gerou maior atividade proteolítica foi de 0,1% (p/v) para as duas enzimas testadas.

Conclusões

O estudo sugere que a concentrações de 0,1% (p/v) de Protezyn® HPF de *Bacillus licheniformis* apresenta elevada atividade proteolítica dentro dos limites testados. Entretanto, após otimização, concluiu-se que o uso combinado das duas proteases não se apresentou eficaz quanto à atividade enzimática, sendo esse um resultado importante para futuras aplicações dessas enzimas.

Agradecimentos

CAPES, CNPq, FAPEMIG, UFLA, LaBBa

Referências

- Khan et al. J. C. Health. **2023**, 75, 193-209.
- El-Saadony et al. Saudi J. Sci. **2021**, 28, 7314-7326.
- Aioub et al. J. Plant. Dis. Prot. **2022**, 129, 1305-1321.
- Sikora et al. CAB International. **2018**, 1-19.
- Sangia et al. Agric. and Health Biol. Essays and Sci. **2024**, 28, 26-33.
- Soares et al. J. of Nat. Pest. Research. **2023**, 4, 100025.
- Njon et al. Parasites & Vectors. **2021**, 14, 302.
- Soares et al. Parasitol. Res. **2013**, 112, 1557-1565.
- Ayres et al. Bio Estat 3.0: statistic app in the areas of biol and med sci. **2003**, 290.