

AValiação DO EFEITO PROTETOR DE COMPONENTES PEPTÍDICOS NA TNase ESTAFILOCÓCICA

Eliza Yoko Hirooka^a
Yuko Yoshimoto^b
Eduardo Vicente^b
Maria de Lourdes R. de Souza^b

RESUMO

A presença de termonuclease (TNase) nos alimentos indica o desenvolvimento abundante de *S. aureus*, o suficiente para produzir enterotoxinas em quantidade crítica e desencadear intoxicação alimentar. O método de TATINI tem sido utilizado para a extração de TNase nos alimentos, porém observou-se perda de atividade enzimática durante o processo. O efeito protetor de proteose peptona n^o 2 e 3, triptona, triptose, extrato de carne, levedura, albumina bovina e infusão de coração e cérebro em concentrações de 0,1 a 5,0% foi analisado sobre 500 ng/ml de nuclease em água e tampão tris. A proteose peptona n^o 3 seguido de extrato de carne apresentou melhor efeito protetor sobre TNase. A albumina bovina a 0,1 e 0,5% proporcionou efeito protetor sobre TNase recém-extraída, entretanto observou-se redução acentuada de atividade após 24 horas, quando comparada com os componentes analisados. Recomenda-se a substituição de albumina bovina por proteose peptona n^o 3 ou extrato de carne a 1,0% para a ressuspensão de TNase extraída diretamente de alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: TNase; *S. aureus*; Enterotoxinas.

1 - INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* produz várias proteínas extracelulares importantes na patogenia das estafilocóccicas (SCHLEIFER, 1986), assim como ao consumidor de produtos contaminados, devido a produção de enterotoxinas (BERGDOLL, 1970; MINOR & MARTH, 1976).

Apesar da detecção direta de enterotoxinas estafilocóccicas ser o método mais preciso (BERGDOLL & REISER, 1980; MEYER & PALMIERI, 1980; FREED et alii, 1982), as dificuldades surgidas na metodologia tem levado ao estudo de produtos metabólicos que impreterivelmente acompanham a produção de toxinas, a termonuclease (TNase), para a triagem de alimentos contaminados (NEEDHAN, 1974; RAYMAN et alii, 1975; PARK et alii, 1978; GELOSA & CIGADA, 1979). A presença de TNase nos alimentos indica desenvolvimento abundante de *S. aureus*, o suficiente para causar intoxicação alimentar. Entretanto, uma vez que esta enzima em alimentos contaminados está presente em concentração de ng, pesquisas descrevem vários processos de extração (TATINI et alii, 1976; EMSWILLER-ROSE et alii, 1980; IBRAHIM, 1981), surgindo um outro problema, devido à perda de atividade enzimática durante a extração. Para minimizar este efeito, tem se utilizado a albumina bovina

(BSA) para proteger a TNase extraída (TUCKER et alii, 1978; IBRAHIM, 1981; IBRAHIM & BALDOCK, 1981).

Em função do alto custo da albumina bovina purificada (BSA), o presente trabalho foi desenvolvido com a finalidade de substituir a BSA por protetores enzimáticos mais acessíveis na manutenção de atividade de TNase estafilocócica extraída de alimentos.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo

A linhagem utilizada foi *S. aureus* 196-E que apresenta entre outras características, a produção de TNase e as enterotoxinas. A e D.

DNase padrão

O estudo da perda de atividade nucleásica por aquecimento foi efetuado utilizando-se concentrações de 0 a 2.500 ng/mL de nuclease microcócica EC 3.1.2.1.1 de *S. aureus* linhagem Foggi da Sigma, em tampão tris 0,05M contendo 0,1% de BSA (Fluka AG ou Sigma).

Determinação de DNase

A DNase foi detectada utilizando o ágar azul de ortotolidina - DNA (TDA) segundo LACHICA et alii (1971), mo-

Recebido em 28/10/87

^a Departamento de Patologia Geral - CCB/UUEL

^b Estagiários do curso de Biologia da disciplina de Microbiologia - CCB/UUEL

dificando-se as condições de reação para pH 10,0 e incubação a 50°C.

Efeito de componentes peptídicos sobre DNase

Os componentes peptídicos em concentrações de 0,1 a 5,0% foram adicionado em 500 ng/mL de nuclease microcócica e a atividade enzimática comparada com a mesma enzima suspendida em água, tampão tris 0,05M pH 8,5 e o tampão adicionado de 0,1% de BSA. Os componentes peptídicos analisados foram proteose peptona nº 2 e 3, triptona, triptose, extrato de levedura, extrato de carne e caldo infusão de coração e cérebro de Difco.

Extração de TNase em caldo BHI inoculado com *S. aureus* 196-E.

A TNase foi extraída seguindo-se essencialmente a metodologia preconizada por TATINI et alii (1976).

200 mL de caldo BHI (Biobrás) foi inoculado com 1,0 mL de cultura de *S. aureus* 196-E e incubado a 37°C por 24 horas. A seguir o sobrenadante de cultura centrifugado a 10.000 rpm/15 min e adicionado de 1:20.000 de mertiolate foi submetido a precipitação com ácido tricloroacético (TCA) 3,0 M. Para 15,0 mL de sobrenadante de cultura foi adicionado 0,0 a 40,0% de TCA 3,0 M, e o precipitado obtido ressuspendido com 1,5 mL de tampão tris 0,05 M pH 10,0 e o mesmo tampão adicionado de 1,0% de proteose peptona nº 3. O extrato obtido foi diluído para 1/10 a 1/400 e o efeito protetor de proteose peptona avaliado, mantendo-se esta suspensão a 4°C e determinando a atividade de nucleásica nos 4 dias consecutivos.

3 - RESULTADOS

De acordo com a Figura I, o tratamento da nuclease pura em tampão tris 0,05 M pH 8,5 adicionado de 0,1% de BSA em banho fervente por 15 min causou perda significativa da atividade enzimática. A redução foi maior em ágar TDA pH 10,0 porém ainda equivalente à mesma atividade analisada a pH 9,0.

Tabela 1 - Avaliação do efeito protetor de proteínas e hidrolizados proteicos sobre DNase microcócica: 500 ng/ml DNase

Meio	concentração	ATIVIDADES DE DNase ^a (mm)									
		Recém adicionado					Após 24 horas				
		0%	5% ^b	5% ^c	1% ^b	1% ^c	0%	5% ^b	5% ^c	1% ^b	1% ^c
1 - H ₂ O		13,0	-	-	-	-	10,5	-	-	-	-
2 - TRIS 0,05M pH 8,5		12,5	-	-	-	-	10,5	-	-	-	-
3 - TRIS + BSA ^d 0,1%		12,8	-	-	-	-	12,0	-	-	-	-
4 - Proteose Peptona nº 2		-	11,0	11,5	12,0	10,0	-	13,2	13,5	12,0	13,0
5 - Proteose Peptona nº 3		-	14,0	15,0	13,0	14,0	-	15,0	15,0	13,5	14,0
6 - Triptona		-	13,5	10,0	12,0	12,0	-	12,0	12,0	11,0	11,0
7 - Triptose		-	11,0	12,0	11,0	11,0	-	14,5	14,5	13,0	13,0
8 - Extrato de carne		-	14,2	14,2	12,0	12,5	-	15,2	15,0	13,5	14,0
9 - Extrato de levedura		-	12,0	11,5	12,5	12,5	-	14,8	14,5	13,0	13,5
10 - BHI ^e		-	13,5	13,5	11,5	11,0	-	14,5	14,5	13,0	13,2

a - Diâmetro de halo de atividade nucleásica após 4 horas de incubação a 50°C em ágar TDA pH 10,0

b - Componentes 4 a 10 dissolvido em H₂O

c - Componentes 4 a 10 dissolvido em tampão tris 0,05M pH 8,5

d - soro albumina bovina

e - Infusão de coração e cérebro

Tabela 2 - Avaliação do efeito protetor de proteose peptona nº 3, extrato de carne e albumina bovina em 500 ng/mL de DNase.

M E I O	Conc.	ATIVIDADE DE DNase ^a (mm)														
		Recém adicionado					24 horas					48 horas				
		2,5%	1,0%	0,5%	0,1%	0,0	2,5%	1,0%	0,5%	0,1%	0,0	2,5%	1,0%	0,5%	0,1%	0,0
H ₂ O		-	-	-	-	12,1	-	-	-	-	11,0	-	-	-	-	9,0
BSA ^b		-	-	15,0	14,5	-	-	-	13,0	11,5	-	-	-	11,2	11,0	-
Proteose Peptona nº 3 ^b		16,0	15,0	14,5	12,7	-	16,0	14,5	14,0	13,0	-	15,5	14,0	13,0	11,5	-
Ext. carne ^b		15,0	14,8	14,0	13,0	-	15,5	14,5	14,0	12,8	-	14,8	14,0	13,5	11,5	-

a - Diâmetro do halo de atividade nucleásica, 50°C/4 horas em ágar TDA pH 10,0

b - Dissolvido em tampão tris 0,05M pH 8,5.

As tabelas 1 e 2 mostram a análise de efeito protetor de diversos componentes peptídicos em 500 ng/mL de nuclease estafilocócica.

O efeito protetor foi melhor quando as suspensões continham maior concentração de componentes peptídicos e dissolvidos em tampão tris 0,05 M pH 8,5 (Tabela 1). O halo de atividade nucleásica foi maior com proteose peptona nº 3 e extrato de carne, observando-se uma perda rápida de atividade quando as enzimas foram dissolvidas somente em água ou tampão tris. Analisando a quantidade de enzima após 24 horas da manutenção de suspensão a 4°C, todos os componentes estudados apresentaram efeito protetor maior do que 0,1% de BSA, exceto triptona.

A seguir, determinou-se a quantidade recomendada de proteose peptona nº 3 e extrato de carne a ser adicionada em tampão tris em 500 ng/mL de nuclease e comparou-se com BSA (Tabela 2). A suspensão da enzima em água praticamente levou à inativação total dentro de 48 horas. Os dois componentes testados apresentaram efeito protetor melhor do que BSA, quando analisados na mesma concentração, indicando perfeita viabilidade da substituição.

As Tabelas 3 e 4 apresentam a quantidade de TCA 3,0 M necessária para a precipitação de TNase e avaliação do efeito protetor de proteose peptona nº 3 em TNase extraída de caldo BHI inoculado com *S. aureus* 196-E. Uma melhor atividade de TNase foi obtida com a adição de 5,0 a 10,0% de TCA 3,0 M. A adição de 1,0% de proteose peptona nº 3 permitiu a manutenção de atividade enzimática no decorrer de 4 dias, em contraste com a ressuspensão do mesmo precipitado em tampão tris.

Tabela 3 - Determinação da quantidade de TCA e efeito protetor de proteose peptona nº 3 na extração^a de TNase de caldo BHI inoculado com *S. aureus* 196-E Após 1 dia de extração.

TAMPÃO	TCA 3,0M (%)	ATIVIDADE DE TNase (mm)	DILUIÇÃO DO EXTRATO					
			0,0	1/10	1/50	1/100	1/200	1/400
TRIS	0,0	-	19,0	16,5	15,5	14,5	13,8	12,5
+	1,0%	pp ^b	19,0	16,5	15,0	14,5	13,5	12,5
	2,5	-	20,5	18,5	16,5	15,5	14,8	14,5
	5,0	-	21,0	18,5	17,5	16,0	15,0	14,2
	7,5	-	21,2	18,5	17,5	16,8	14,8	13,8
	10,0	-	21,2	19,0	17,5	16,8	14,5	13,8
	20,0	-	21,2	18,5	16,5	15,2	14,5	13,8
	40,0	-	20,0	18,0	16,0	15,2	14,0	13,2
TRIS	0,0	-	18,0	15,5	13,0	12,0	11,5	11,0
	1,0	-	17,0	14,0	12,0	12,0	10,8	11,0
	2,5	-	18,5	16,5	14,0	13,5	12,5	11,5
	5,0	-	19,5	16,5	14,5	13,5	12,5	11,5
	7,5	-	19,5	16,5	14,5	14,0	12,5	11,5
	10,0	-	19,2	14,0	14,0	13,5	12,0	10,0
	20,0	-	19,2	13,5	13,5	13,0	11,5	10,5
	40,0	-	17,5	13,5	13,5	13,0	11,0	10,5

a - Método de Tatini et alii

b - pp - proteose peptona nº 3

Tabela 4 — Determinação da quantidade de TCA e efeito protetor de proteose peptona nº 3 na extração^a de TNase de caldo BHI inoculado com *S. aureus* 196-E após 4 dias de extração

TAMPÃO	TCA 3,0M (%)	ATIVIDADE DE TNase (mm)	DILUIÇÃO DO EXTRATO					
			0,0	1/10	1/50	1/100	1/200	1/400
TRIS	0,0		19,0	16,8	14,0	13,0	13,0	12,5
+ 1%pp ^b	1,0		19,0	16,5	14,0	13,0	13,0	12,5
	2,5		21,0	18,8	15,5	15,0	15,0	14,8
	5,0		21,0	19,0	16,5	15,5	15,0	14,5
	7,5		21,0	19,0	16,0	15,5	15,0	13,5
	10,0		21,0	19,0	16,0	15,5	15,0	14,5
	20,0		20,0	18,0	16,0	15,5	15,0	14,5
	40,0		19,0	17,5	15,8	14,8	14,5	13,0
TRIS	0,0		19,0	16,0	10,0	10,0	10,0	10,0
	1,0		17,5	11,0	9,0	10,0	10,0	10,0
	2,5		19,5	16,0	9,0	9,0	10,0	10,0
	5,0		20,0	16,5	9,0	9,0	10,0	10,0
	7,5		20,0	17,5	14,0	13,0	10,0	10,0
	10,0		19,5	16,5	10,5	10,5	10,0	10,0
	20,0		18,5	14,5	10,0	10,5	10,0	10,0
	40,0		17,0	14,8	10,0	10,0	10,0	10,0

a - Método de Tatini et alii.

b - pp - proteose peptona nº 3

4 - DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Apesar de TNase ser considerada termoestável, a perda de atividade apresentada na Figura 1 também foi observada por outros autores, e TUCKER et alii (1978) tem relatado procedimentos para a estabilização da enzima. A perda de atividade foi maior com baixa concentração de TNase, sugerindo que em alta concentração, pode ocorrer proteção mútua contra desnaturação. Este fato tem sido observado com a enterotoxina estafilocócica, onde o valor de D va-

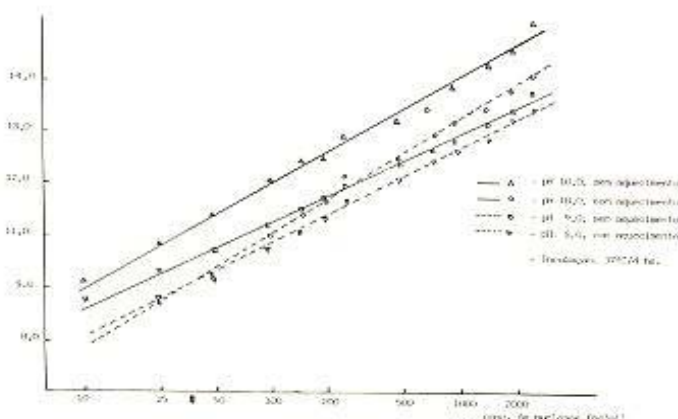


Figura 1 - Efeito de pH de meio BHI e aglutinante (BSA) fornecido por 15 min) na atividade de BSA estafilocócica.

riou com diferentes concentrações de toxina (DENNY et alii, 1971). Segundo HAUROWITZ (citado por DENNY et alii, 1971), a interferência é devida a proximidade intermolecular de cadeias polipeptídicas nativas firmemente enoveladas que dificultam a desnaturação.

A variação no efeito protetor observada entre os componentes peptídicos (Tabelas 1 e 2), provavelmente esteja relacionada com o grau de hidrólise e peso molecular de peptídeos presentes. LEE et alii (1977) demonstraram que a inativação térmica de enterotoxina B ocorre rapidamente em filtrado de caldo de carne, assim como a hidrólise do caldo com tripsina e quimotripsina destruiu parcialmente o efeito protetor, quando comparado com o meio sem tratamento.

A proteose peptona nº 3 e extrato de carne isoladamente na ausência da enzima, não interferiram na reação (dados não apresentados), inclusive sendo os halos de hidrólise de DNA menores do que uso exclusivo de água ou tampão. Quanto ao extrato de levedura, como ocorreu esverdeamento do ágar TDA dificultando a interpretação dos resultados, foi inviabilizada a sua utilização.

A adição de 20,0 a 40,0% de TCA 3,0M no sobrenadante de cultura de *S. aureus* 196-E (Tabelas 3 e 4) proporcionou maior precipitação proteica, mas observou-se maior perda de atividade enzimática. Assim, a atividade foi inferior à precipitação com 10,0% de TCA 3,0M, porém maior do que o halo formado com o sobrenadante de cultura sem extração, indicando a necessidade do processo de concentração de TNase em alimentos contaminados. Entretanto, a desnaturação de TNase extraída pelo método de TATINI et alii (1976) foi significativa, sugerindo o uso de quantidade mínima de TCA, que está em torno de 5,0%, de solução 3,0M.

Comparando-se a atividade nucleásica no extrato de cultura obtido no 1º e 4º dia (Tabelas 3 e 4), observou-se manutenção ou um ligeiro aumento da atividade no extrato sem diluição ou na diluição 1/10. Estes dados indicam que além da TNase estar concentrada, provavelmente as impurezas presentes protegem a enzima da desnaturação. A perda de atividade em diluições subsequentes pode estar relacionada à desnaturação proteica, e em parte, devido à retenção da nuclease na parede do tubo, cujo efeito pode ser minimizado pela adição de BSA, segundo TUCKER et alii (1978).

Tendo em vista os resultados obtidos (Tabela 2), tanto a proteose peptona nº 3 como extrato de carne 1% mostraram ser eficazes na proteção da atividade enzimática e desta maneira, recomendamos a sua utilização para a ressuspensão de TNase estafilocócica extraída de alimentos ou sobrenadantes de culturas.

ABSTRACT

Thermonuclease (TNase) in the food affects growth of *S. aureus* at a critical level to produce enterotoxins and develop foodborne intoxications. It was seen that TATINI method used for TNase concentration lost much enzyme activity during the extraction process. The effect of protease peptone nº 2 and 3, tryptone, tryptose, meat and yeast extract, bovine albumin and brain heart infusion at 0,1 to 5,0% were analysed on 500 ng/mL of nuclease in water and tris buffer. Proteose peptone nº 3 followed meat extract showed better protective effect on the TNase. Bovine albumin at 0,1 and 0,5% protected recently extracted TNase, but a decrease was observed on the activity across 24 hours manutention, when compared to other peptidic compounds analysed. We suggest the use of 1,0% proteose peptone nº 3 or meat extract for ressuspension of TNase extracted from foods.

KEY WORDS: TNase; *S. aureus*; Enterotoxins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERGDOLL, M.S. Enterotoxins. In: MONTIE, T.C.; KADIS, S.; AIL, S. J. *Microbial toxins*. New York, Academic Press, 1970. v. 3, p. 265-326.
2. BERGDOLL, M.S. & REISER, R. Application of radioimmunoassay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *J. Food. Protection*, 43(1):68-72, 1980.
3. DENNY, C.; HUMBER, J.Y.; BOHRER, C.W. Effect of toxin concentration on the heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A in Beef bouillon and in phosphate buffer. *Appl. Microbiol.*, 21(6):1064-6, 1971.
4. EMSWILLER-ROSE, B.S.; JOHNSTON, R.W.; HARRIS, M.E.; LEE, W.H. Rapid detection of staphylococcal thermonuclease on casings of naturally contaminated fermented sausages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40(1): 13-8, 1980.
5. FREED, R.C.; EVENSON, M.L.; REISER, R.F.; BERGDOLL, M.S. Enzyme-Linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(6):1349-55, 1982.
6. GELOSA, L. & CIGADA, F. Thermonuclease as pathogenicity test for staphylococci. *Industria Alimentari*, 18(7/8): 548-50, 1979.
7. IBRAHIM, G.F. A simple sensitive method for determining staphylococcal thermonuclease in cheese. *J. Appl. Bacteriol.*, 51:307-12, 1981.
8. IBRAHIM, G.F. & BALDOCK, A.K. Thermostable deoxyribonuclease content and enterotoxigenicity of cheddar cheese made with subnormal starter activity. *J. Food Protect.*, 44(9):655-60, 1981.
9. LACHICA, R.V.F.; GENIGEORGIS, C.; HOEPRICH, P.D. Methachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.*, 21: 585-7, 1971.
10. LEE, I.C.; STEVENSON, K.E.; HARMON, L.G. Effect of beef broth protein on the thermal inactivation of staphylococcal enterotoxin B. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33(2):341-4, 1977.
11. MEYER, R.F. & PALMIERI, M.J. Single radial immunodiffusion method for screening staphylococcal isolates for enterotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40(6) 1080-5, 1980.
12. MINOR, T.E. & MARTH, E.H. *Staphylococci and their significance in foods*. Amsterdam, ELSEVIER, 1976, 297 p.
13. NEEDHAN, J.R. A study of the coagulase and deoxyribonuclease tests applied to staphylococci from non-human sources. *Medical. Lab. Technol.*, 31:141-3, 1974.
14. PARK, C.E.; ELDEREA, H.B., Rayman, M.K. Evaluation of staphylococcal thermonuclease (TNase) assay as a means of screening foods for growth of staphylococci and possible enterotoxin production. *Can. J. Microbiol.*, 24 (10):1135-9, 1978.
15. RAYMAN, M.K.; PARK, C.E.; PHILPOTT, J.; TODD, E.C.D. Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease tests as means of identifying *S. aureus*. *Appl. Microbiol.*, 29(4):451-4, 1975.
16. SCHLEIFER, K.H. Gram-positive cocci. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1986. v. 2. p. 999-1103.
17. TATINI, S.R.; CORDS, B.R.; GRAMOLI, J. Screening for staphylococcal enterotoxins in food. *Food Technol.*, 30(4):64-74, 1976.
18. TUCKER, P.W.; HAZEN, E.E.; COTTON, F.A. Staphylococcal nuclease reviewed: a prototypic study in contemporary enzymology. I. Isolation; physical and enzymatic properties. *Mol. Cell. Biochem.*, 22(2-3):67-77, 1978.