



Subproduto Agroindustrial Milhocina Usado como uma Fonte de Indução da Produção de Proteases por *Arthrospira platensis*

Priscila Danielly Santos de Barros¹, Pábulo Eugênio da Costa e Silva¹, Daniela Araújo Viana Marques², Polyanna Nunes Herculano³, Raquel Pedrosa Bezerra³, Ana Lúcia Figueiredo Porto³

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, Universidade Federal de Pernambuco (Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária - Recife - PE),

² Universidade de Pernambuco - Campus Serra Talhada (Av. Afonso Magalhaes, s/n, Bairro Nossa Senhora da Conceição - Serra Talhada - PE),

³ Laboratório de Tecnologia de Bioativos – LABTECBIO, Universidade Federal Rural de Pernambuco (Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – Recife – PE).

RESUMO

*Proteases são biocatalisadores e, atualmente, a sua disponibilidade não atende às demandas industriais. Desta forma, é necessária a prospecção de novos micro-organismos produtores, como a *Arthrospira platensis*. *A. platensis* foi cultivada autotrófica e mixotroficamente com 0,2% e 0,3% de milhocina e a biomassa obtida foi rompida por homogeneização ou sonicação. O extrato obtido foi centrifugado e o sobrenadante utilizado para a determinação da atividade proteásica e de proteínas totais. Os extratos obtidos pelo método de homogeneização apresentaram valores superiores quando comparados aos do método de sonicação. Os extratos da biomassa cultivada mixotroficamente obtiveram atividades proteásicas maiores que o cultivos autotróficos. Assim, o maior valor de atividade proteásica foi de $104,38 \pm 16,20$ U/mg, no extrato homogeneizado da biomassa cultivada mixotroficamente com 0,2% de milhocina. Desta forma, pode-se concluir que a *A. platensis* é promissora para a produção de proteases e a adição de milhocina pode aumentar a produção enzimática.*

Palavras-chave: Cianobactérias, Cultivo mixotrófico, subproduto agroindustrial, Proteases, Biotecnologia.

INTRODUÇÃO

Proteases catalisam a hidrólise de proteínas e, por conseguinte, desempenham um papel essencial em várias aplicações como na indústria alimentícia, de detergentes e farmacêutica (KAMRAN et al., 2015). A vasta aplicabilidade fez com que essas enzimas se consolidassem como um dos principais grupos de biocatalisadores disponíveis no mercado, cobrindo cerca 60% do mercado total de enzimas em todo o mundo (NOVELLI et al., 2015). Atualmente mais de 3000 enzimas estão sendo usados em vários processos industriais (KAMRAN et al., 2015). No entanto, a disponibilidade atual de moléculas com atividade biológica não atende por completo às demandas industriais. As proteases estão presentes em



todos os organismos - vegetais, animais e micro-organismos. Entretanto, do ponto de vista científico e comercial, as provenientes de micro-organismos são mais utilizadas, já que estes são uma fonte de rápido desenvolvimento, requerem um menor espaço para o cultivo e são de fácil manipulação genética (WARD, 1983).

A utilização de resíduos para uma maior produção de biomassa por micro-organismos e o aproveitamento de suas enzimas é uma nova tendência, desta forma, a prospecção de novos micro-organismos produtores de protease e o aperfeiçoamento da tecnologia de fermentação são necessários para atender a crescente demanda por esta enzima (RATHAKRISHNAN et al., 2012).

Levando em consideração que aproximadamente 30 a 40% do custo envolvido na produção de proteases está relacionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento do micro-organismo (LADEIRA et al., 2010), faz-se necessário a busca de meios de cultura de baixo custo (CHAUHAN & GUPTA, 2004).

Nos últimos anos, uma diversidade de subprodutos da indústria agrícola ou resíduos agroindustriais têm sido estudados com a finalidade de formular substratos para produção de proteases (MUKHERJEE et al., 2008). A milhocina é um subproduto agroindustrial proveniente do processamento do milho que apresenta grande potencial de reuso devido a sua composição e características físico-químicas, além dos benefícios ambientais. É constituída por carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais, vitaminas e fosfato (RIVAS et al., 2004). Neste sentido, objetivou-se determinar o potencial da *Arthrospira platensis* em produzir enzimas com atividade proteolítica em condições autotrófica e mixotrófica de crescimento, além de selecionar o melhor método de extração dessas proteases.

MATERIAL E MÉTODOS

Arthrospira platensis (UTEX, 1926) foi obtida da coleção de cultura da Universidade do Texas (UTEX, 2011), e cultivada em meio padrão Schlösser (1982). Os cultivos foram realizados a uma concentração celular inicial de 50 mg.L^{-1} , em mesa agitadora e frequência de agitação de 100 rpm, temperatura de $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e iluminância de $50 \pm 5 \text{ } \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Nos cultivos mixotróficos, foram adicionados ao meio de cultura padrão 0,2 e 0,3% de milhocina, tratada segundo Liggett & Koffler (1948). Dois métodos de extração de proteases foram utilizados, um por homogeneização, utilizando tampão fosfato (PB), pH 7.0 a 0.1 M (Matsubara et al. (2000), durante 30 minutos a temperatura ambiente; e por sonicação em pulsos de 1 minuto durante 10 minutos em banho de gelo. Em seguida, os extratos celulares foram centrifugados a 15,000 rpm durante 10 minutos a 4°C , e os sobrenadantes utilizados para as análises posteriores. A dosagem de proteínas foi realizada utilizando o Kit BCA (BCATM Protein Assay Kit, Thermo SCIENTIFIC) e a determinação da atividade proteolítica foi determinada conforme Alencar et al. (2003), utilizando espectrofotômetro a 450 nm e azocaseína como substrato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Tabela 1, a *Arthrospira platensis* cultivada nos meios autotrófico e mixotróficos apresentaram atividade proteolítica entre $22,08 \pm 3,31 \text{ U/mg}$ e $104,38 \pm 47,42 \text{ U/mg}$. De forma geral, pode-se observar que os extratos sonicados apresentaram uma maior atividade catalítica o que provavelmente se deve ao fato desta metodologia atingir um maior nível de ruptura celular e, conseqüentemente, uma maior liberação de metabólitos sintetizados



pela *A. platensis*. Além de evidenciar que as proteases provenientes da *A. platensis* são estruturalmente resistentes à sonicação, que apesar de ser um método mais brusco, certamente não modificou a estrutura espacial das enzimas estudadas e, portanto, não interferiu na sua atividade catalítica. Em contrapartida, os índices relativamente menores encontrados nos extratos homogeneizados podem indicar a liberação de proteases presentes apenas na parede das células, tendo em vista que este não é um método efetivo para a partição celular.

Pode-se observar que os cultivos mixotróficos apresentaram produção de proteases superiores quando comparadas com os cultivos autotróficos (Tabela 1). Sendo assim, torna-se evidente a capacidade da milhocina em induzir uma maior produção de proteases intracelulares pela cianobactéria estudada. Especialmente quando este resíduo é utilizado numa concentração $\geq 0,2\%$, aumentando significativamente a atividade proteolítica do extrato que apresentou $104,38 \pm 16,20$ U/mg de enzimas. Esta mesma concentração também apresentou o maior resultado entre os extratos homogeneizados, o que pode propor que também houve uma maior indução de proteases que se agregam a parede celular quando comparado ao cultivo sem a fonte orgânica de carbono. Tendo em vista os resultados expostos, pode-se sugerir que o resíduo agroindustrial em questão pode ser utilizado como um substrato para a produção biotecnológica de proteases.

Tabela 1. Resultados experimentais da biomassa de *Arthrospira platensis* cultivada em função de diferentes variáveis de milhocina submetida a homogeneização.

Amostra	TP	P _{act} (U/mg)
Autotrófico Son.	$1,801 \pm 0,269^a$	$70,61 \pm 9,85^A$
Autotrófico Hom.	$1,429 \pm 0,183^a$	$25,60 \pm 3,84^B$
Milhocina 0,2% Son.	$1,099 \pm 0,322^b$	$104,38 \pm 16,20^C$
Milhocina 0,2% Hom.	$1,473 \pm 0,051^a$	$41,12 \pm 6,14^D$
Milhocina 0,3% Son.	$1,475 \pm 0,069^a$	$103,67 \pm 10,42^C$
Milhocina 0,3% Hom.	$2,363 \pm 0,065^c$	$22,08 \pm 3,31^B$

TP = Proteínas totais; P_{act} = Atividade proteásica; Son. = Extrato sonicado; Hom. = Extrato homogeneizado.

^{a, b, c, A, B, C, D} Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

CONCLUSÕES

Concluiu-se que o substrato utilizado para a produção da enzima a partir da *Arthrospira platensis* é bastante viável, o que também contribui para a utilização de um subproduto agroindustrial e minimização de problemas ambientais. A cianobactéria se mostrou adequada para o cultivo com milhocina, além de ser uma fonte de produção de enzimas proteolíticas. Comparando os valores obtidos a partir da atividade proteolítica, verificou-se que o extrato sonicado proveniente da biomassa da cianobactéria cultivada com



0,2% de milhocina apresentou aumento significativo na produção de proteases, se mostrando uma promissora fonte de enzimas para a aplicação industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alencar RB, Biondi MM, Paiva PMG, Vieira VLA, Carvalho Jr LB, Bezerra RDS. 2003. Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. *Brazilian Journal of Food Technology* 6:279-84.

Chauhan B. & Gupta R. 2004. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14. *Process Biochemistry* 39:2115-2122.

Kamran A, Rehman HU, Qader SAL, Baloch AH, Kamal M. 2015. Purification and characterization of thiol dependent, oxidation-stable serine alkaline protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 13:59-64.

Ladeira AS, Andrade MV, Delatorre AB, Perez VH, Martins LLM. 2010. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. *Química Nova* 33:324-328.

Liggett RW & Koffler H. 1948. Corn steep liquor in microbiology. *Bacteriological reviews* 12:297.

Matsubara K, Hori K, Matsuura Y, Miyazawa K. 2000. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme and identification of fibrinogen clotting enzyme in a marine green alga, *Codiumdivaricatum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 125:137-143.

Mukherjee AK, Adhikari H, Rai SK. 2008. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal* 39:353-361.

Novelli PK, Barros MM, Fleuri LF. 2015. Novel inexpensive fungi proteases: production by solid state fermentation and characterization. *Food Chemistry* 198:119-124.

Rathakrishnan P, Nagarajan P, Kannan RR. 2012. Optimization of process parameters using a statistical approach for protease production by *Bacillus subtilis* using cassava waste. *International Journal of ChemTech Research* 4:749-760.

Rivas B, Moldes AB, Domínguez JM, Parajó JC. 2004. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. *International journal of food microbiology* 97:93-98.

Schösser UG. 1982. Sammlung von Algenkulturen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. 95:181-276.

Ward OP. 1983. Proteinases. In: *Microbiol Enzymes and Biotechnology* Fogarty, WM. (Ed.): Applied Science Publishers. New York. p. 251-305.