

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Produção de proteases por *Aspergillus japonicus* DPUA 542 utilizando subprodutos agrícolas

Elzilene dos Santos Ferreira¹; Dib Mady Diniz Gomes¹; Fabiano Brito Prado¹; Salomão Rocha Martim¹; Maria Francisca Simas Teixeira¹

¹Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Instituto de Ciências Biológicas – ICB
Departamento de Parasitologia. Email: elzilenef@gmail.com.
Caixa-postal 69077-000 Manaus, AM – Brasil.

RESUMO

*As proteases são enzimas multifuncionais, representam aproximadamente 60% do mercado de enzimas e são produzidas por animais, vegetais e micro-organismos. Entre esses, os fungos são fontes potenciais devido à sua diversidade bioquímica, suscetibilidade à manipulação genética e alta produtividade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do tamanho do inóculo na produção de proteases por *Aspergillus japonicus* DPUA 542 utilizando diferentes resíduos agroindustriais. Em cada substrato foi inoculado 5% e 10% de suspensão de esporo/10g de resíduos e a fermentação foi conduzida a 30 °C. Após sete dias as enzimas foram extraídas em água destilada e o extrato bruto recuperado foi mantido sob refrigeração. Para determinação da atividade proteolítica foi utilizada como substrato azocaseína 1% (p/v) em Tampão Tris HCl 0,1M, pH 7,2. A atividade proteolítica com valor significativo (84,02±9,19 U/mL e 78,99±1,56 U/mL) foi determinada em farelo de arroz quando foram utilizados 5% e 10% de suspensão de esporos.*

Palavras-chaves: Proteases, *Aspergillus japonicus*, resíduos agroindustriais, fermentação em estado sólido.

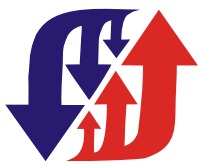
INTRODUÇÃO

Proteases representam um grupo de enzimas hidrolíticas muito importante devido ao seu potencial para aplicação biotecnológica em vários processos industriais, como indústrias de alimentos, detergentes, têxteis, couro, produtos lácteos e preparações farmacêuticas. Tais enzimas podem ser isoladas de animal, vegetal ou micro-organismos e são classificadas de acordo com o pH, em proteases ácidas (pH 2,0 a 6,0), neutras (pH 6,0 a 8,0) e alcalinas (pH 8,0-13,0) (Silva, 2011; Souza *et al.*, 2015).

Entre os micro-organismos, os fungos são excelentes representantes para produção de proteases devido à grande diversidade, facilidade de crescimento, adaptação em diferentes ambientes e a possibilidade de manipulação genética (Koblitz, 2010; Castro *et al.*, 2014).

Aspergillus, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola*, *Thermoascus*, *Thermomyces* são fungos comumente investigados para produção de enzimas proteolíticas extracelulares pela tecnologia da fermentação em estado sólido devido suas propriedades. (Souza *et al.*, 2015).

As enzimas proteolíticas podem ser produzidas por fermentação submersa (FSm) e sólida (FES), todavia para o crescimento de fungos, a FES torna-se mais adequada devido os substratos sólidos serem análogos ao habitat natural dos fungos, condição que favorece o crescimento e a secreção de diversas enzimas extracelulares (Almeida *et al.* 2010).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Além disso, FES é uma tecnologia que se mostra mais atraente pela simplicidade, o baixo custo, a alta produtividade, concentração de enzimas e a utilização de resíduos agrícola amplamente disponível como substrato (Castro *et al.*, 2014). Assim sendo, o presente trabalho objetivou verificar a influência de diferentes resíduos e da concentração do inóculo na produção de proteases por *Aspergillus japonicus* DPUA 542.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foi avaliado *Aspergillus japonicus* DPUA 542, cedido pela Coleção do de Culturas DPUA, do Departamento de Parasitologia, da Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Para produção das enzimas, a cultura estoque foi obtida em ágar Czapek extrato de levedura (CYA) e mantida por sete dias, a 25 °C.

Fermentação em estado sólido

Na fermentação em estado sólido foram utilizados os seguintes subprodutos agroindustriais: (i) serragem; (ii) casca de arroz e (iii) farelo de arroz. Os resíduos tratados, com umidade aferida para 60% foram acondicionados em tubo de ensaio 20 x 2,5cm e esterilizados a 121 °C por 60 minutos. Para obtenção do inóculo, na cultura estoque foi adicionado 10mL de água destilada esterilizada. Após dispersão da massa micelial, dessa suspensão celular de concentração 10^{-1} , foi retirado volume equivalente a 500 $\mu\text{L/g}$ ou 1000 $\mu\text{L/g}$ de resíduo em base úmida para inoculação em 10g de resíduo, pH 6,0. A fermentação foi realizada a 30°C por sete dias. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Extração das Enzimas

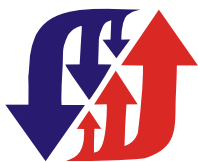
Para obtenção do extrato bruto e determinação da atividade proteolítica, foram adicionados 50 mL de água destilada esterilizada, em 10 g de resíduo em frasco de Erlenmeyer de 125 mL. Em seguida, essa mistura foi submetida à agitação (200 rpm) por 15 minutos, a 30°C. O material sólido foi separado utilizando papel de filtro Whatman, sob vácuo e, o extrato bruto recuperado foi centrifugado a 8000xg por 10 minutos. No final deste processamento, em todos os substratos foi aferido o pH.

Determinação da Atividade da Protease

Para determinar a atividade proteolítica foram utilizados 250 μL azocaseína 1% (p/v) em Tampão Tris HCl 0,1M, pH 7,2 e, 150 μL do extrato bruto. A mistura foi incubada por 60 minutos, em câmara escura. A reação foi interrompida pela adição 1,2 mL de ácido Tricloroacético 10% (p/v). Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 4°C, a 10000 rpm. Após centrifugação, 1,2 mL do sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio contendo 1,4 mL de hidróxido de sódio 1M, incluindo o branco. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a leitura realizada a 440nm. Uma unidade de atividade de protease corresponde à quantidade de enzima necessária para uma variação na absorbância igual a 0,01, em uma hora e expressa em U/mL (Silva Neves *et al.*, 2006).

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e médias utilizando o programa Minitab Versão 17.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nos experimentos realizados com *A. japonicus* DPUA 542, a análise estatística revelou que somente o substrato influenciou na produção das enzimas, sem diferença significativa da concentração do inóculo (Figura 1). As proteases foram produzidas em todos os substratos avaliados, todavia, a maior atividade proteolítica foi verificada no farelo de arroz. Outro resultado observado no final da fermentação foi a variação do pH entre 4,5 a 6,0, no extrato bruto, parâmetro que indica a excreção de diferentes proteases pelo fungo filamentososo investigado.

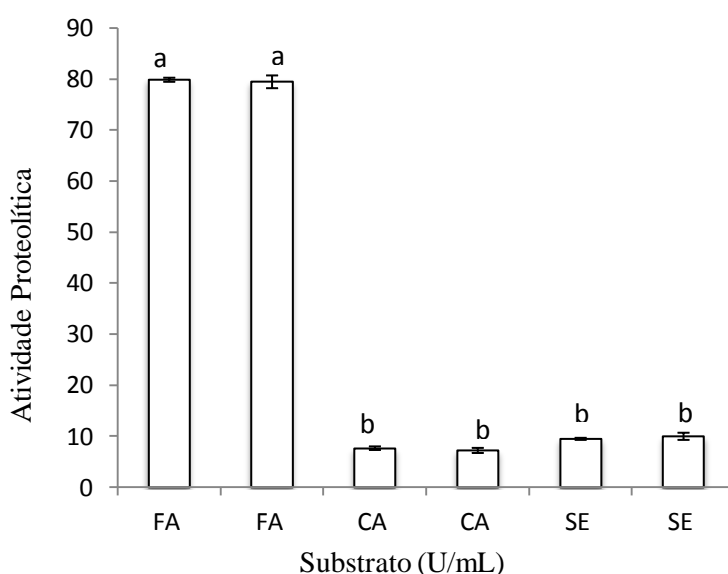
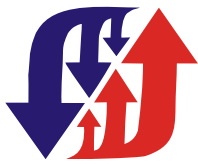


FIGURA 1. Atividade proteolítica de *A. japonicus* utilizando como inóculo volume de suspensão celular equivalente a 0,5 ou 1,0g de resíduo, em base úmida. FA: farelo de arroz; CA: casca de arroz e SE: serragem.

A atividade proteolítica significativa observada no farelo de arroz, provavelmente seja decorrente do conteúdo abundante de carboidratos, aminoácidos e lipídios nesse substrato (Silveira & Furlong, 2007). A alta concentração de aminoácidos, entre 15 e 20% da massa seca encontrada no farelo de arroz, entre outros parâmetros, facilitou o crescimento do fungo, visto que aminoácidos são importantes fonte de nitrogênio (Embrapa, 2000; Silveira & Furlong, 2007).

Parâmetros, como a temperatura, o tempo de fermentação associados à composição do meio e a capacidade de germinação dos esporos também influenciam na síntese das enzimas microbianas (Silva Neves *et al.*, 2006).

Em relação à baixa atividade determinada no extrato bruto recuperado da casca de arroz e serragem pode ser em consequência da baixa concentração de nitrogênio oriundo dos substratos utilizados para o crescimento do *A. japonicus* (Fernandes *et al.*, 2015 ; Sales - Campos *et al.*, 2010). Provavelmente este resultado esteja associado à alta concentração de sílica presente na casca de arroz, condição que impediu o acesso do fungo aos nutrientes. Técnicas estão sendo desenvolvidas, a exemplo da quebra das ligações celulose-sílica por



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

ultrassom para tornar a casca de arroz um substrato passível de fermentação por *Aspergillus* (Yang *et al.*, 2012; Kalapathy *et al.*, 2000).

CONCLUSÕES

Todos os produtos agrícolas proporcionaram o crescimento e a produção de proteases por *Aspergillus japonicus* DPUA 542, todavia as maiores atividades enzimáticas foram determinadas em farelo de arroz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida CAV, Rocha CP, Vieira RB, Filho UC, Cardoso VL. 2010. Produção de Protease de *Aspergillus niger* no Cultivo em Estado Sólido em Biomassa de Arroz e Maracujá. Health and Environment World Congress.372-376.

Castro RJS, Nishide TG, Sato HH.2014. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 236-245. Disponível em: <http://www.elsevier.com/locate/bab>. Acesso em: 03/03/2016.

Campos CS, Araujo LM, Minhoni MTA, Andrade MCN. 2010. Análise Físico-Química e Composição Nutricional da Matéria Prima e de Substratos Pré e Pós Cultivo de *Pleurotus* tratadas Interciência. Asociación Interciência 35:70-76. . Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo>. Acesso em: 03/03/2016.

Fernandes I J, Santos ECAD, Oliveira R, Reis CAMM, Modolo RCE. 2015. Caracterização do Resíduo industrial Casca de arroz com Vistas a sua Utilização como Biomassa. 6º Fórum Internacional de Resíduos Sólidos. 1-9.

Kalapathy U, Proctor A, Shultz J.2000.A simple method for production of pure silica from rice hull ash. BioresourceTechnology-Elsevier.73:257-26.

Koblitz M G B. 2010. Bioquímica de Alimentos: Proteases. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 78.

Lima GJML, Martins RR, Zanotto DL, Brum PAR.2000. Composição Química e Valores de Energia de Subprodutos do Beneficiamento de Arroz. 1-2. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br> . Acesso em: 09/03/2016

Silva AC, Queiroz AESF, Costa RP, Porto TS, Motta CMS, Porto ALF, Moreira K A. 2011. Produção de Fitase *Aspergillus japonicus* URM5633. Através da Fermentação Sólida do farelo de arroz.

Silveira CM, Furlong EB. 2007. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. Ciênc. Tecnol. Aliment. 27: 805-811.

Souza PM, Bittencourt MLA, Caprara CC, Freitas M, Almeida RPC, Silveira D, Fonseca YM, Filho EXF, Souza POM. 2015. A biotechnology perspective of fungal proteases. Journal of Microbiology.337-346.

Silva NKC, Porto ALF, Teixeira MFS. 2006. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. Acta Amazonica. Manaus, 6:299-306.

Yang C-Y, Sheih C, Fang TJ. 2012. Fermentation of rice hull by *Aspergillus japonicus* under ultrasonic pretreatment. UltrasonicsSonoChemistry-Elsevier.19:687-691.Disponível em: <http://www.elsevier.com>.Acesso em:10/03/2016.