



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Produção de Proteases por espécies de *Aspergillus* da Micoteca DPUA

Larissa Svetlana Cavalcante Silva¹, Salomão da Rocha Martim¹, Ana Rita Gaia Machado¹, Taciana Amorim¹, Maria Francisca Simas Teixeira¹

¹ Universidade Federal do Amazonas - Instituto de Ciências Biológicas - Departamento de Parasitologia
Avenida Rodrigo Otávio - 6200 – Coroado I - Manaus - AM - Email: larissasvetlanas@gmail.com

RESUMO

Proteases são enzimas economicamente importantes e podem ser sintetizadas por uma gama de fungos filamentosos, incluindo as espécies do gênero Aspergillus. Estas enzimas podem ser produzidas por fermentação semi-sólida e submersa, sendo que a fermentação submersa tem propriedades vantajosas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de proteases por fermentação submersa utilizando quatro espécies de Aspergillus da Micoteca DPUA. A produção de proteases foi realizada em MGYD, pH 6, durante 96 horas. Todas as espécies (Aspergillus niger DPUA 398, A. pulverulentus DPUA 478, A. oryzae DPUA 1624, A. flavus T3D1) produziram proteases nas condições de fermentação. Destes, Aspergillus oryzae foi o que expressou maior quantidade de enzimas proteolíticas (185,11 U/mL ± 0,77), com diferença significativa entre as espécies. Estes resultados promissores mostraram que as espécies estudadas possuem diferentes características fisiológicas e também são fontes de proteases.

Palavras-chave: Enzimas, fermentação submersa, fungos.

INTRODUÇÃO

As proteases ganharam um grande espaço nos diversos setores produtivos, substituindo catalisadores químicos nas indústrias têxteis, farmacêuticas, de detergentes, de alimentos e bebidas e de recuperação de prata de raio-X (Pasha et al., 2013). Esse grupo de enzimas pode ser produzido por fermentação semi-sólida ou submersa. A fermentação submersa consiste no cultivo de micro-organismos em meio líquido padronizado que forneça condições ideais para crescimento e produção enzimática (Nyonzima e More, 2013). Esta técnica de fermentação tem muitas vantagens em relação a fermentação semi-sólida, pois parâmetros físicos e químicos podem ser facilmente controlados, como pH, concentração de nutrientes disponíveis, aeração, além da fácil recuperação enzimática (Sandhya et al., 2005; Colla et al., 2016). Segundo Chandrasekaran et al. (2015) e Ortiz et al. (2016) fungos filamentosos têm sido bastante utilizados nas indústrias, inclusive espécies do gênero *Aspergillus*, pela alta capacidade de secretar enzimas no meio de crescimento. Assim sendo este trabalho teve por objetivo avaliar a produção de proteases por fermentação submersa por quatro espécies de *Aspergillus* da Micoteca DPUA.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

MATERIAL E MÉTODOS

As espécies *Aspergillus niger* DPUA 398, *Aspergillus pulverulentus* DPUA 478, *Aspergillus oryzae* DPUA 1624 e *Aspergillus flavus* T3D1 preservadas em água destilada esterilizada foram cedidas pela Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas. O subcultivo foi preparado em ágar Czapek suplementado com Extrato de Levedura (CYA), em tubos de ensaio, mantido a 25 °C, por 7 dias. De cada cultivo foi preparada uma suspensão de esporos de modo a se obter uma concentração final, em 200 mL do meio, de 106 esporos/mL. A fermentação submersa foi realizada em frasco de Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio MGYB [extrato de malte 0,3% (p/v); glicose 1% (p/v); extrato de levedura 0,3% (p/v) e peptona 0,5% (p/v)], a 25°C, por 96h, sob agitação de 180 rpm. Ao término da fermentação a biomassa na forma de *pellets* foi separada do sobrenadante por filtração a vácuo e o extrato bruto filtrado em membrana de acetato de celulose (0,45 µm). A atividade proteolítica foi determinada segundo Alecrim et al. (2015), onde 150 µL do extrato bruto foram adicionados a 250 µL de azocaseína 1% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2. A mistura foi incubada por 1 hora a 25 °C em câmara escura e interrompida pela adição de 1,2 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v). A centrifugação foi realizada durante 10 minutos, 10000 rpm. Do sobrenadante recuperado foram retirados 800 µL e transferido para 1,4 mL de hidróxido de sódio 1 M. Os sistemas de reação e o branco foram feitos em triplicata e a leitura realizada a 440 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzimas capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,01 em 1 hora, expressa em U/mL. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% de significância e médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de significância, utilizando-se o “Software MiniTab 16”.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Estudos recentes têm demonstrado que espécies de *Aspergillus*, como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, são produtoras de enzimas proteolíticas, o que é interessante para as indústrias, visto que os fungos filamentosos possuem uma ampla diversidade genética, são facilmente manipuláveis e a massa micelial pode ser removida por filtração (Castro e Sato, 2014; Souza et al., 2015). Neste estudo, realizado em 96 horas, foi observado que todas as espécies avaliadas se mostraram eficientes na produção de proteases (Tabela 1). Porém, *Aspergillus oryzae* DPUA 1624 foi a espécie que demonstrou maior valor significativo de atividade proteolítica (185,11 U/mL ± 0,77), seguido de *Aspergillus flavus* T3D1 (26,89U/mL ± 0,38). Em ordem decrescente de atividade, *Aspergillus niger* DPUA 398 (9,78U/mL ± 0,38) e *Aspergillus pulverulentus* DPUA 478 (9,56U/mL ± 0,38) foram as espécies com menor atividade proteolítica. Estes dados mostram que a variação dos valores de atividade das proteases depende diretamente da fisiologia das espécies que se pretende utilizar no estudo. A espécie *Aspergillus oryzae* não é considerada toxigênica e é uma grande produtora de proteases por fermentação, sendo utilizadas nas indústrias japonesas para fabricação de sake (vinho de arroz) e molho de soja (Pascoal et al., 2014). Hamada et al. (2013) verificou que proteases deste fungo também podem ser utilizadas como aditivos na fabricação de pães sem glúten.

Ao final da fermentação o pH variou de neutro, nos extratos de *A. niger*, *A. pulverulentus* e *A. flavus*, a levemente alcalino, nos extratos de *A. oryzae*. Enzimas



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

proteolíticas com pH alcalino têm sido utilizadas como aditivos em detergentes, no curtimento de couro e na produção de molho de soja (Zambare et al., 2011; Murakami et al., 2014).

Tabela 1. Atividade de proteases produzidas por espécies de *Aspergillus* da Micoteca DPUA em 200 mL de MGYB [extrato de malte 0,3% (p/v); glicose 1% (p/v); extrato de levedura 0,3% (p/v) e peptona 0,5% (p/v), pH 6,0], a 180 rpm, durante 96 horas

Espécies	Substrato (Procedência)	Atividade proteases (U/mL)	pH extrato bruto
<i>Aspergillus niger</i> DPUA 398	Serragem ¹	9,78 ± 0,38 ^d	7,0
<i>Aspergillus pulverulentus</i> DPUA 478	Serragem ¹	9,55 ± 0,38 ^d	7,5
<i>Aspergillus oryzae</i> DPUA 1624	Serragem ¹	185,11 ± 0,77 ^a	8,0
<i>Aspergillus flavus</i> T3D1	Carapaça ²	26,89 ± 0,38 ^b	7,0

Médias seguidas pelas mesmas letras não se diferenciam uma da outra pelo Teste de Tukey (p<0.05).

¹Pilha de Serragem; ²Carapaça de tartaruga.

CONCLUSÕES

Todas as espécies de *Aspergillus* estudadas secretaram proteases, sendo que *Aspergillus oryzae* DPUA 1624 se mostrou um excelente produtor. Estudos complementares devem ser realizados para promover o entendimento das características fisiológicas desta espécie e seu potencial biotecnológico, bem como futura aplicação industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alecrim MM, Palheta RA, Teixeira MFS, Oliveira IMA. 2015. Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo-furcatis* strains on Amazonian fruit waste. *Int J Food Sci Technol* 50: 151-157.
- Castro RJS, Sato HH. 2014. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: Na evaluation of the physical-chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. *Biocatal Agric Biotechnol* v 3: 20-25.
- Colla LM, Primaz AL, Benedetti S, Loss RA, Lima M, Reinehr CO, Bertolin TE, Costa JAV. 2016. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. *Braz. J. Microbiol* [online] Disponível em: doi:10.1016/j.bjm.2016.01.028.
- Hamada S, Suzuki K, Aoki N, Suzuki Y. 2013. Improvements in the qualities of gluten-free bread after using a protease obtained from *Aspergillus oryzae*. *J Cereal Sci* 57: 91-97.
- Murakami K, Ishida Y, Masaki A, Tatsumi H, Murakami S, Nakano E, Motai H, Kawabe H, Arimura H. Isolation and Characterization of the Alkaline Protease Gene of *Aspergillus oryzae*. *Agric Biol Chem* [Online] Disponível em: <http://www.tandfonline.com/loi/tbbb19>
- Nyonzima FN, More SS. Screening and optimization of cultural parameters for an alkaline protease production by *Aspergillus terreus* gr. under submerged fermentation. 2013. *Int J Pharm Bio Sci* 4: 1016 - 1028.
- Ortiz GE, Nosedá DG, Ponce MC, Recupero MN, Blasco M, Albertó E. 2016. A Comparative Study of New *Aspergillus* Strains for Proteolytic Enzymes Production by Solid State Fermentation. *Hindawi Publishing Corporation Enzyme Research* 1-11.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Pascoal NLO, Cordeiro SA, Pinto GAS. 2014. Production of proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* grown by solid state fermentation using canola meal as substrate. BMC Proceedings 8:177.

Pasha KM, AnuradhaP, Rao DS. 2013. Screening of a pectinolytic fungal strain; *Aspergillus foetidus* MTCC 10367 for the production of multiple enzymes of industrial importance. Int J Pharm Bio Sci 4:1205-1209.

Sandhya C, Sumantha A, Szakacs G, Pandey A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process Biochem 40: 2689–2694.

Souza P M, Bittencourt MLA, Caprara CC, Freitas M, Almeida RPC, Silveira D, Fonseca YM, Ferreira-Filho EX, Pessoa-Junior A, Magalhães PO. 2015. A biotechnology perspective of fungal proteases. Braz J Microbiol 46: 337-346.

Zambare V, Nilegaonkar S, Kanekar P. 2011. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. N Biotechnol 28:173-181.