



Estudo das Condições de Recuperação de Protease Produzida por Fermentação Semi-sólida.

Ruann Janser Soares de Castro^{1,2}, Rosa Ferreira Araújo de Abreu^{1,3},
Gustavo Adolfo Saavedra Pinto¹

¹Embrapa Agroindústria Tropical - Laboratório de Bioprocessos
Rua Dra. Sara Mesquita, 2270 CEP: 60511-110 Fortaleza-CE - E-mail: gustavo@cnpat.embrapa.br

²Universidade Federal do Ceará – Depto. de Engenharia de Alimentos
Caixa Postal 12168 – 60356-000 Fortaleza – CE - E-mail: ruannjanser@hotmail.com

³Rede Nordeste de Biotecnologia-UECE - E-mail:rosafaa@yahoo.com.br

RESUMO

*Um aspecto muito importante na fermentação em estado sólido é a recuperação adequada dos metabólitos produzidos. A eficiência da extração é um fator crítico que determina a viabilidade econômica da fermentação semi-sólida para produção de enzimas. Não menos importante que a eficiência da extração, o conhecimento sobre as características de atuação de uma enzima são indispensáveis para sua aplicação. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as condições de recuperação de protease produzida por *Aspergillus oryzae* IV em fermentação semi-sólida utilizando torta de girassol como substrato, através dos seguintes parâmetros: volume de extrator, agitação e pH da solução extratora. Os resultados obtidos mostraram que a utilização de 200mL de solução extratora para cada 40g de meio fermentado permitiram uma maior recuperação da enzima que apresentou atividade proteolítica máxima (185,5 U.g⁻¹) em pH 5,0. A agitação não mostrou um efeito significativo sobre a recuperação da protease.*

Palavras-chave: extração, agitação, atividade proteolítica.

INTRODUÇÃO

As enzimas proteolíticas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas produzidas comercialmente (UYAR e BAYSAL, 2004), e têm aplicação em diferentes indústrias, como de alimentos, têxtil, farmacêutica e de detergentes (HORIKOSHI, 1999; KANEKAR *et al*, 2002; MADIGAN *et al*, 1996).

Todas as enzimas são sensíveis à concentração de íons H⁺ no meio, existindo uma zona de pH em que a atividade enzimática é máxima. As proteases são classificadas em ácidas, neutras e alcalinas em relação à faixa de pH em que as atividades são ótimas (SANDHYA *et al*, 2005).

Proteases ácidas são endopeptidases, com massas moleculares no intervalo 30-45 kDa, que dependem de ácido aspártico para a sua atividade catalítica e mostra atividade máxima em pH baixo. Proteases ácidas oferecem uma variedade de aplicações nas indústrias de bebidas e alimentos (VISHWANATHA *et al*, 2009) e apresentam faixa ótima de pH entre 2,0 e 4,0 (GIONGO, 2006). As proteases neutras são ativas em uma faixa estreita de pH, entre 5,0 e 8,0, e possuem baixa termotolerância. Algumas destas proteases, como as metaloproteases,



necessitam de íons metálicos divalentes para melhorar suas atividades enzimáticas (SEONG *et al*, 2004). São bastante utilizadas na indústria de alimentos por possuírem a função de hidrolisar aminoácidos hidrofóbicos, restritos ao pH neutro, conseqüentemente reduzindo o amargor das proteínas hidrolisadas nos alimentos (SANDHYA *et al*, 2005). Já as proteases alcalinas são caracterizadas pela sua alta atividade em pH alcalino, grande especificidade pelo substrato, elevada resistência a altas temperaturas e pela sua capacidade de resistir a ambientes com baixa atividade de água (TAKAMI *et al.*, 1990). Este grupo de enzimas apresenta melhor produção em uma faixa de pH de 6,0 a 13,0 (TARI e GENCKAL, 2006). Fungos do gênero *Aspergillus* são bastante explorados na produção de enzimas proteolíticas. Dados encontrados na literatura revelam que fungos desse gênero têm capacidade de sintetizar os três tipos de proteases: ácida (VISHWANATHA *et al*, 2009), neutra (SANDHYA *et al*, 2005) e alcalina (HAJJI *et al*, 2008).

Um aspecto muito importante na fermentação em estado sólido é a recuperação adequada dos metabólitos produzidos. A eficiência da extração é um fator crítico que determina a viabilidade econômica da fermentação semi-sólida para produção de enzimas (SANTOS, 2007). Diferentes autores discutem sobre a necessidade de maiores estudos sobre técnicas de recuperação de enzimas em meios semi-sólidos, pois as existentes ainda são muito ineficientes comprometendo diretamente a exploração desse tipo de processo para produção de enzimas comerciais e em grande escala (KUMAR e LOSANE, 1987, RAMADAS *et al*, 1995, CASTILHO *et al*, 1997, DANIEL *et al*, 1996, SANTOS, 2007).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar as melhores condições de recuperação de protease obtida a partir de um processo fermentativo em estado sólido; para isto avaliou-se a utilização de diferentes relações volume de extrator por massa de meio fermentado, o efeito da agitação e do pH da solução extratora.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo: o microrganismo empregado foi *A. oryzae* IV, previamente selecionado como uma linhagem produtora de proteases. A linhagem é mantida estocada (-18°C) na coleção de trabalho do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical, Ceará.

Preparação dos meios de inoculação: as fermentações foram conduzidas em erlenmeyers de 500mL com 40g de meio de cultivo, baseado em torta de girassol umidificada na proporção de 50mL de água para cada 100g de torta. Os frascos foram esterilizados a 121°C durante 15 minutos e inoculados com suspensão de esporos na concentração de 10^7 esporos.g⁻¹. O conteúdo foi homogeneizado e incubado a 30°C por 24h. Todas as condições de cultivo foram previamente determinadas como ideais para produção de proteases por *A. oryzae* IV.

Determinação da atividade proteolítica: a atividade proteolítica foi determinada segundo a metodologia de CHARNEY e TOMARELLI (1947), utilizando azocaseína como substrato e ácido tricloroacético como agente de precipitação. A formação do composto cromóforo ocorreu pela adição de solução de hidróxido de potássio 5N. A leitura da intensidade de cor ocorreu a 428 nm. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de 0,01 de absorvância por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições de ensaio.



Influência dos volumes de extrator e da agitação na atividade proteolítica: a extração do complexo enzimático foi realizada pela adição de solução tampão acetato 200 mM pH 5,0 aos meios fermentados e mantidos a 30°C por 60 minutos. O estudo das condições de extração envolveu a utilização de diferentes volumes de extrator (100, 200, 300 e 400mL para cada 40g de meio fermentado) e agitação (0, 50, 100 e 150rpm). O complexo enzimático foi obtido por filtração com papel qualitativo. A fase líquida resultante foi recolhida e conservada a -18°C em frascos rosqueados para análises. A atividade enzimática nessa etapa foi determinada utilizando a solução de azocaseína em pH 5,0.

Influência dos pH's de extração na atividade proteolítica: utilizou-se tampão acetato 200mM para os valores de pH de 4,0 e 5,0, e tampão fosfato 200mM para valores de pH 6,0, 7,0 e 8,0. A solução extratora teve seu pH verificado antes e após o processo de extração por método potenciométrico. A atividade enzimática nessa etapa foi realizada utilizando a solução de azocaseína em três faixas de pH: ácida (pH 5,0), neutra (pH 7,0) e alcalina (pH 8,0).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Influência dos volumes de extrator e da agitação na atividade proteolítica

A solução extratora manteve sua característica tamponante ao longo do processo de extração, o que pôde ser observado pelas pequenas variações nos valores de pH após a extração (Tabela 1).

Tabela 1-pH's das soluções extradoras antes e após a extração

pH do extrator	pH do extrator antes da extração	pH do extrator após a extração
4,0	4,07	4,48
5,0	5,08	5,36
6,0	6,03	5,94
7,0	7,05	6,76
8,0	7,94	7,42

O aumento do volume de extrator promoveu um aumento na recuperação da atividade proteolítica, a partir do meio sólido. Devido a presença de distintos metabólitos no meio fermentado, o volume de 100mL não foi suficiente para a extração total da enzima, provavelmente ocasionado pela saturação do meio líquido. O uso de volumes de extrator superiores a 200mL mostrou valores similares de atividade proteolítica recuperada total (Figura 1). GHILDYAL *et al* (1991) afirmam que em fermentação semi-sólida, é essencial que o processo de extração mantenha uma importante característica deste tipo de cultivo: a obtenção do produto de forma concentrada. A produção de um extrato diluído pode destruir este aspecto economicamente vantajoso dos sistemas semi-sólidos. Nesse contexto, elevadas razões volume de extrator por massa de meio devem ser evitadas. Desta forma, sugere-se a utilização do volume de 200mL de solução extratora para cada 40g de meio fermentado (razão de 5:1), visando à extração do complexo enzimático de forma concentrada e eficiente, com conseqüente diminuição dos custos operacionais. Este valor se mostra igual ao relatado por SANTOS (2007), que estudando as condições de extração de poligalacturonase em

fermentação semi-sólida verificou que esta razão foi a mais adequada para recuperação da enzima. A agitação da suspensão não mostrou um efeito significativo sobre a recuperação da protease. Contudo, notou-se uma tendência de redução com o aumento da agitação. (Figura 1).

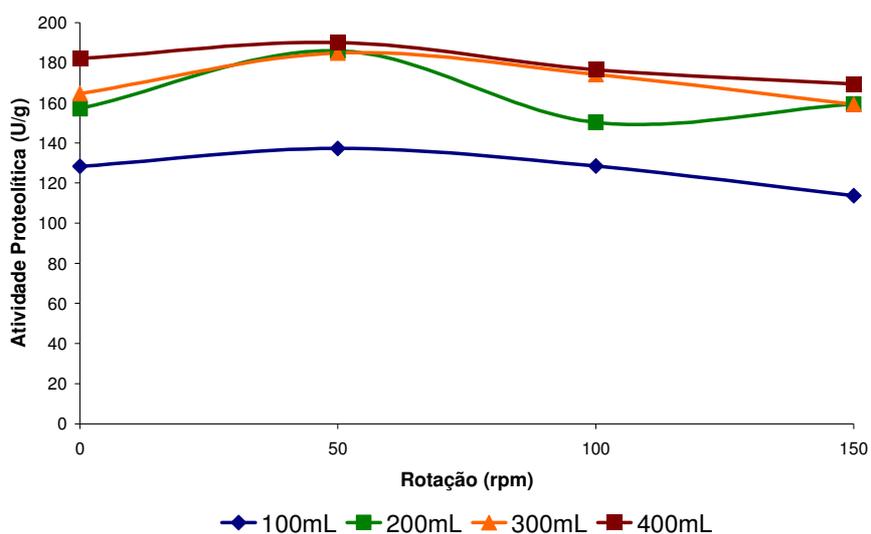


Figura 1 – Efeito da agitação e dos volumes de extrator na recuperação da protease.

Influência dos pH's de extração na atividade proteolítica

Todos os extratos enzimáticos obtidos utilizando-se soluções extratoras com diferentes pH's apresentaram atividade proteolítica, onde destacaram-se as amostras analisadas na faixa ácida (pH 5,0), alcançando uma produção de $185,5 \text{ U.g}^{-1}$ de protease (Figura 2). No geral, as amostras analisadas nas faixas neutra e alcalina apresentaram resultados inferiores (Figura 2).

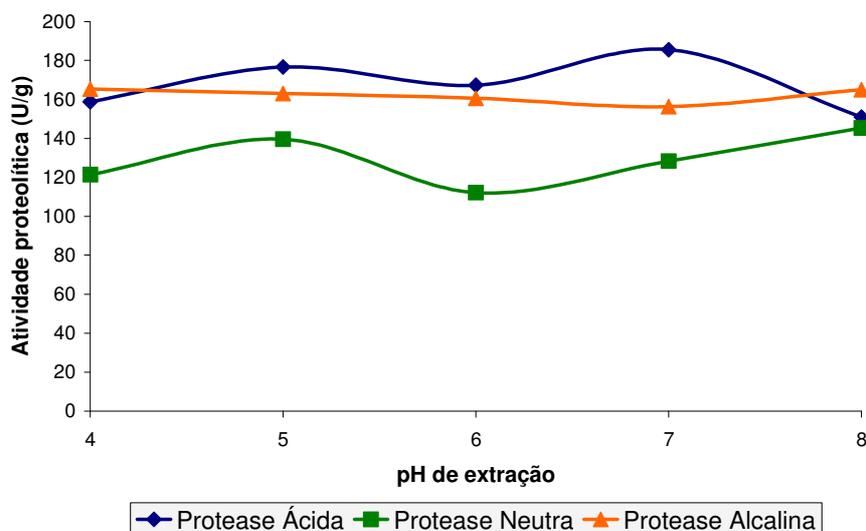


Figura 2 – Efeito do pH da solução extratora na atividade proteolítica



A grande diversidade de enzimas produzidas por fermentação semi-sólida é largamente relatada na literatura, dentre as quais podemos citar proteases ácidas, alcalinas e neutras. VISHWANATHA (2009), ao estudar a estabilidade de uma protease produzida por *A. oryzae* MTCC 5341, verificou que a enzima permanecia estável em uma faixa de pH entre 2,5 e 6,5 e apresentou atividade máxima nos pH's entre 3,0 e 4,0. SEONG *et al.* (2004), estudando uma protease produzida por *Streptomyces tendae*, observou que a atividade máxima da enzima ocorreu em pH 6,0, mantendo-se estável em uma faixa de 4,0 a 9,0. IKASARI e MITCHELL (1996), avaliaram o efeito do pH de análise na atividade de protease produzida por *Rhizopus oligosporus*, utilizando um intervalo de 1,5 a 11. Os resultados encontrados por estes autores revelaram que a enzima apresentou atividade em pH's entre 1,5 e 5,0, com máxima atividade em pH 2,0. GERMANO *et al.* (2003), estudando a estabilidade de protease produzida por *Penicillium* sp. em fermentação semi-sólida verificou que a enzima manteve-se estável em pH's entre 6,0 e 9,0. Os dados encontrados na literatura condizem com os obtidos neste trabalho, principalmente no que diz respeito à estabilidade da protease em relação ao pH. Todos os relatos remetem a enzimas com atuação em ampla faixa de pH, sejam elas ácidas, alcalinas ou neutras.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram que 200mL de solução extratora para cada 40g de meio fermentado permitiu uma maior recuperação da enzima. A agitação não mostrou um efeito significativo sobre a recuperação da enzima. O pH da solução extratora ideal foi 5,0. A enzima apresentou atividade em toda a faixa de pH testada, tendo atividade proteolítica máxima em pH de análise 5,0, atingindo 185,5 U.g⁻¹.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASTILHO, L. R. (1997), Recuperação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- CHARNEY, J. & TOMARELLI, R.M., (1947), A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chemical.*, v. 23, p. 501-505.
- DANIEL, M. R., SILVA, V. T. C., CASTILHO, L. R., LEITE, S. G. F., MEDRONHO, R. A. (1996), Extração de pectinases produzidas por fermentação semi-sólida. *Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados (ENEMP)*, Uberlândia, v.2, p. 685-689.
- GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. (2003), Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p. 246-251.
- GHILDYAL, N. P., RAMAKRISHNA, M., LONSANE, B. K., KARANTH, N. G. (1991). Efficient and simple extraction of mouldy bran in a pulsed column extractor for recovery of amyloglucosidase in concentrated form. *Process Biochemistry*, v. 26, p. 235-241.
- GIONGO, J. L. (2006), Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.



HAJJI, M., REBAI, A., GHARSALLAH, N., NASRI, M. (2008), Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.79, p. 915–923.

HORIKOSHI, K. (1999), Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v 43, p.735-750.

IKASARI, L. & MITCHELL, D. (1996) A. Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v.19, p.171-175.

KANEKAR, P. P., NILEGOANKAR, S. S., SARNAIK, S. S., KELKAR, A. S. (2002), Optimization of Protease Activity of Alkaliphilic Bacteria Isolated From an Alkaline Lake in India. *Bioresource Technology*, v. 85, p. 87-93.

KUMAR, P. K. R., LONSANE, B. K., (1987). Extraction of gibberellic acid from dry mouldy bran produced under soli state fermentation. *Process Biochemistry*, v.22, p. 139-143.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. (1996), *Brock Biology of Microorganism*, 8 Edição, Ed. Pretince Hall, New Jersey, 986p.

RAMADAS, M., HOLST, O., MATTIASSON, B. (1995). Extraction and purification of amyloglucosidase produced by solid state fermentation with *Aspergillus niger*. *Biotechnology Techiniques*, v. 9, n. 12, p. 901-906.

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 Biochemistry*, v. 40, p. 2689-2694.

SANTOS, F. M. S. (2007), Estudo da produção de pectinases por fermentação e estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. *Tese de Doutorado*. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

SEONG, C.; JO, J. S.; KIM, S. W.; LEE, O.; HEE, J.; YOO, J. C. (2004), Production, purification and characterization of a novel thermostable serine protease from soil isolate, *Streptomyces tendae*. *Biotechnology letters*, v.26, p.907-909.

TAKAMI, H.; AKIBA, T.; HORIKISHI, K. (1990), Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.34, p.157.

TARI, C.; GENCKAL, H. (2006), Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp isolates from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 703-710.

UYAR, F.; BAYSAL, Z. (2004), Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. Under solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 39, p.1893-1898.

VISHWANATHA, K. S., RAO, A., SINGH, S. A. (2009), Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*, v. 114, p. 402-407.