



DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM EXTRATOS ENZIMÁTICOS OBTIDOS POR MÚLTIPLAS EXTRAÇÕES E PRODUÇÃO DE PROTEASE DURANTE REINCUBAÇÃO DE FARELO DE TRIGO EM FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA

R. J. S. de CASTRO^{1,3}, A. C. de FREITAS^{2,3} e G. A. S. PINTO³

¹Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Alimentos
e-mail: ruannjanser@hotmail.com

²Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química
e-mail: adrianacfreitas@yahoo.com.br

³Embrapa Agroindústria Tropical, Laboratório de Bioprocessos
e-mail: gustavo@cnpat.embrapa.br

RESUMO – O presente trabalho teve como objetivo determinar a atividade proteolítica de extratos enzimáticos obtidos por múltiplas extrações e estudar a produção desta enzima durante reincubação de farelo de trigo em fermentação semi-sólida. Os meios foram esterilizados, inoculados com suspensão de esporos e incubados a 30°C durante 24h. Os extratos enzimáticos foram obtidos mediante adição de solução tampão ao meio fermentado e posterior filtração em papel qualitativo. Os meios fermentados foram submetidos a três extrações consecutivas, sendo coletadas amostras a cada extração para análises. Após as extrações, os meios foram reincubados durante 72h, com amostras coletadas a cada 24h. Os resultados mostraram que após a primeira extração (17,65 U.mL⁻¹), a atividade proteolítica nos extratos foi decrescente, havendo uma recuperação de 26,72 e 13,44% de atividade na segunda e terceira extrações, respectivamente, quando comparadas a primeira. Já nos meios submetidos à reincubação houve síntese de nova protease atingindo 30% da produção inicialmente obtida.

PALAVRAS-CHAVE: protease, extrações, reincubação.

1. INTRODUÇÃO

Um grande número de micro-organismos não-patogênicos é capaz de produzir enzimas, dentre eles, os fungos filamentosos são particularmente interessantes devido ao seu fácil cultivo e produção de enzimas extracelulares potencialmente aplicáveis industrialmente (GUIMARÃES *et al.*, 2006).

Aspergillus oryzae é uma espécie considerada não toxicogênica, apresentando um longo histórico de uso industrial (VISHWANATHA, RAO e SINGH, 2009). A história molecular do organismo *A. oryzae* mostra que o mesmo tem a maior expansão de genes hidrolíticos (135 genes proteolíticos), tornando-o um grande produtor de proteases (MACHIDA *et al.*, 2005).



As enzimas proteolíticas merecem destaque, pois respondem por mais de 65% de todo o mercado mundial de enzimas (OSKOUIE *et al.*, 2008), sendo 40% desse total de proteases de origem microbiana (RAO *et al.*, 1998). Na indústria de alimentos, algumas aplicações são bastante conhecidas, como na fabricação de queijos, clarificação de cerveja e produção de proteína hidrolisada (VISHWANATHA, RAO e SINGH, 2009). Estas enzimas podem ser obtidas por fermentação submersa ou por fermentação semi-sólida (FSS). A FSS constitui um processo de grande importância comercial visto a possibilidade de produção de inúmeros metabólitos de alto valor agregado, como enzimas. A produção de enzimas extracelulares por micro-organismos em FSS apresenta várias vantagens econômicas quando comparada a fermentação submersa, dentre as quais podemos citar: o uso de agro-resíduos industriais como substratos simples, requisito mínimo de água e produção de metabólitos de forma mais concentrada (CHELLAPAN *et al.*, 2006).

Um aspecto muito importante na fermentação semi-sólida 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, 1997, DANIEL *et al.*, 1996, SANTOS, 2007). Assim, parâmetros que envolvam esse tipo de processo devem ser investigados

continuamente a fim de aperfeiçoar técnicas e diminuir custos de produção.

O presente trabalho teve como objetivo determinar a atividade proteolítica de extratos enzimáticos obtidos por múltiplas extrações e estudar a produção desta enzima durante reincubação de farelo de trigo em fermentação semi-sólida.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

O micro-organismo empregado foi *A. oryzae* IV, pertencente à coleção de trabalho do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical em Fortaleza-CE.

2.2 Preparação do inóculo

O micro-organismo foi cultivado em ágar nutritivo a 30°C. As suspensões de esporos foram extraídas com 10mL de solução estéril de 0,3% (v/v) tween 80. Em seguida, 1mL da suspensão de esporos foi adicionada a frascos contendo 10g de farelo de trigo enriquecido com 4mL de uma solução 1,7% m/v NaHPO₄.H₂O e 2,0% m/v (NH₄)₂SO₄, incubados a 30°C por 4 dias. Os esporos foram extraídos do farelo de trigo com 50mL de solução 0,3% (v/v) tween 80 para contagem em câmara de Neubauer.

2.3 Substrato

A matéria-prima utilizada como substrato foi o farelo de trigo gentilmente cedido pelo Moinho Dias Branco.

2.4 Processo fermentativo

As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers de 500mL com 40g de meio de cultivo, baseado em farelo de trigo umidificado. Os frascos foram esterilizados,



inoculados com suspensão de esporos e incubados a 30°C por 24h. Para a realização da etapa de reincubação, os meios inicialmente fermentados foram submetidos às extrações e reincubados por um período de 72h com coleta de amostras a cada 24h.

2.5 Determinações de umidade e atividade de água (A_w)

A umidade inicial nos meios foi determinada segundo metodologia descrita em Instituto Adolf Lutz (IAL, 2004). A atividade de água foi medida em aparelho AQUALAB Decagon modelo CX-2.

2.6 Obtenção dos extratos enzimáticos e reincubação do meio fermentativo

A extração do complexo enzimático foi realizada pela adição de 200mL de solução tampão acetato 200 mM pH 5,0 aos meios fermentados e mantidos a 30°C por 60 minutos. 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. As fermentações conduzidas nas primeiras 24h de incubação foram submetidas a três extrações consecutivas com coleta dos extratos enzimáticos a cada extração. Já nos meios que passaram por reincubação, o processo de extração foi único em cada tempo avaliado.

2.7 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 absorbância por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições de ensaio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A recuperação máxima observada ocorreu durante o período de incubação e no extrato enzimático obtido na 1ª extração (ponto correspondente ao tempo de reincubação zero (0) da Figura 1), atingindo 17,65 U.mL⁻¹. Quanto às extrações, os resultados mostraram que após a primeira extração, a atividade proteolítica nos extratos foi decrescente, havendo uma recuperação de 26,72% (4,72 U.mL⁻¹) e 13,44% (2,37 U.mL⁻¹) de atividade na segunda e terceira extrações, respectivamente, quando comparadas a primeira (Figura 1). Estes dados evidenciam que a maior parte da enzima foi recuperada já na primeira extração, mas também mostraram que quantidades remanescentes das proteases sintetizadas pelo fungo continuaram presentes no meio fermentativo. Diante do exposto, é válido avaliar-se até que ponto a realização de múltiplas extrações para a recuperação adicional de enzimas produzidas durante um processo fermentativo é vantajosa do ponto de vista econômico, visto que essa operação pode implicar em uma redução nos custos, por exemplo, diminuindo o número de fermentações necessárias para se conseguir uma determinada quantidade de enzimas, além da economia com substrato, energia e diminuição do tempo de obtenção.

Nos meios submetidos à reincubação houve síntese de nova protease durante todo o período avaliado, atingindo até 30% da produção inicialmente obtida (Figura 1).

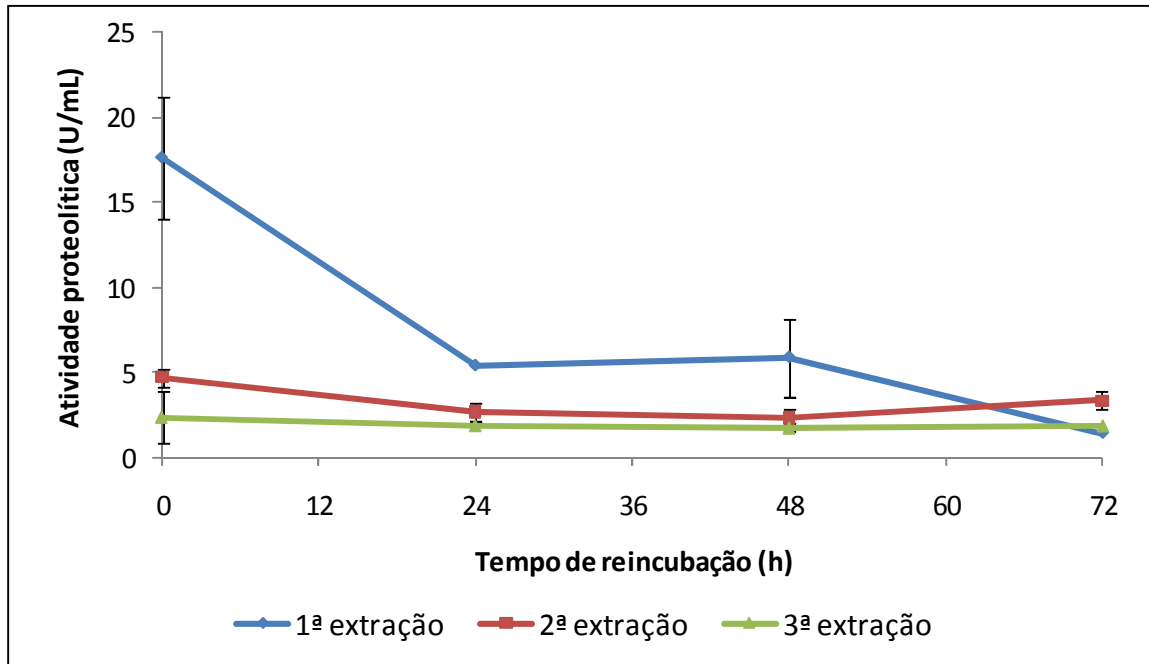


Figura 1 – Atividade proteolítica de extratos enzimáticos obtidos por múltiplas extrações e síntese de proteases durante reincubação de farelo de trigo em fermentação semi-sólida.

Essa queda observada pode ser explicada pela mudança no perfil de umidade e A_w provocada pela adição da solução tampão durante as extrações e consequente absorção pelo substrato.

A umidade apresentou um aumento de 53,2% para 86,5% na primeira extração, mantendo valores próximos nos meios submetidos às extrações subsequentes (Figura 2).

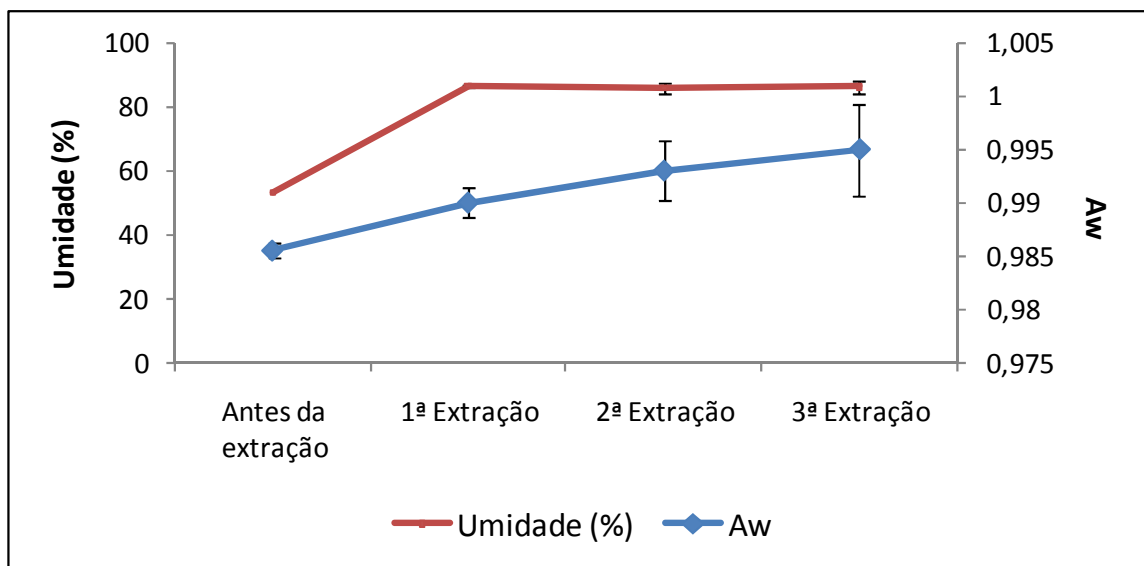


Figura 2 - Perfil de umidade e A_w nos meios submetidos a múltiplas extrações.



Freitas, Castro e Pinto (2009), avaliaram a produção de protease durante reincubação de torta de canola, e observaram queda na produção de 52,7%; estes mesmos autores atribuíram este fato ao aumento da umidade e Aw. Acuña-Arguelles *et al.*, (1994) afirmam que a quantidade de água presente no meio afeta o metabolismo microbiano levando a modificações na membrana celular, nos mecanismos de transporte e na síntese enzimática.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos evidenciaram a viabilidade da realização de extrações subsequentes para uma maior recuperação da enzima e que a reincubação não se mostrou uma alternativa eficaz na síntese de protease.

5. REFERÊNCIAS

ACUÑA-ARGUELLES, M.; GUTIERREZ-ROJAS, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; Effect of water activity on exo-pectinase production by *A. niger* CH4 in solid state fermentation. *Biotechnology letters*, v.16, p. 23-28, 1994.

CASTILHO, L. R. Recuperação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida. Rio de Janeiro, UFRJ: 1997. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CHARNEY, J. & TOMARELLI, R.M., A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chemical.* v.170, n. 23, p.501-505, 1947.

CHELLAPPAN, S., JASMIN, C., BASHEER, S. M., ELYAS, K. K., BHAT,

S. G., CHANDRASEKARAN, M. Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v.41, p. 956-961, 2006.

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. In: *Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados (ENEMP)*, v.2, p. 685-689, Uberlândia /MG, outubro.

FREITAS, A. C., CASTRO, R. J. S., PINTO, G. A. S. Estudo da produção de protease durante a incubação e reincubação do meio semi-sólido. In: *Encontro de Pesquisa e Pós-graduação do IFETCE*, 2009, Fortaleza. *Anais... Fortaleza: IFETCE*, 2009. 1CD.

GUIMARÃES, L. H. S., NOGUEIRA, S. C. P., MICHELIN, M., RIZZATTI, A. C. S., SANDRIM, V. C., ZANOELO, F. F., AQUINO, A. C. M. M., JUNIOR, A. B., POLIZELI, M. L. T. M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p.474-480, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 4ª ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p.70-71, 2004.

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



MACHIDA, M., ASAI, K., SANO, M., TANAKA, T., KUMAGAI, T., & TERAJ, G. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438, 1157–1161, 2005.

OSKOUIE, S. F. G., TABANDEH, F., YAKHCHALI, B., EFTEKHAR, F. Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. *Biochemical Engineering Journal*, v.39, p.37–42, 2008.

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

RAO, M. B., TANKSALE, A. M., GHATGE, M.S., DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspect of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol R* 1998;62:597–635.

SANTOS, F. M. S. Estudo da produção de pectinases por fermentação e estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. Natal, UFRN: 2007. 148p. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

VISHWANATHA, K. S., RAO, A. G., SINGH, S. A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s10295-009-0654-4, 2009.