



ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DE PROTEASE EM PROCESSO FERMENTATIVO SEMI-SÓLIDO

A. C. de FREITAS^{1,2}, R. J. S. de CASTRO^{1,3} e G. A. S. PINTO¹

¹Embrapa Agroindústria Tropical
e-mail: gustavo@cnpat.embrapa.br

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

³Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Alimentos
e-mail: ruanjanser@yahoo.com.br

RESUMO – A fermentação semi-sólida destaca-se no aproveitamento e bioconversão de resíduos agroindustriais. O presente trabalho objetivou avaliar as condições de extração da protease do meio semi-sólido como agitação, pH e volume do tampão de extração. Os extratos enzimáticos foram obtidos adicionando tampão acetato 200 mM ao meio fermentado e filtração. A atividade proteolítica foi determinada por método espectrofotométrico utilizando solução de azocaseína como substrato. A agitação do meio durante o processo de extração influenciou em um aumento de 17 % na obtenção da enzima, já a diminuição do volume de tampão ocorreu a concentração da enzima no extrato enzimático em relação do controle. Quando variou o pH do tampão de extração e da solução de azocaseína simultaneamente, a enzima apresentou atividade nos diferentes pH avaliados, a maior produção de protease observada foi de 395 U.g⁻¹ em 96 horas de processo fermentativo, extraída em tampão acetato 200 mM pH 7,0 e pH 7,0 da solução de azocaseína.

PALAVRAS-CHAVE: torta de canola; pH; agitação.

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos representam um importante papel na produção de enzimas. As enzimas de origem microbiana podem ser obtidas a partir de técnicas que utilizam fermentação submersa ou fermentação semi-sólida. Na escala de produção mundial de enzimas microbianas, as proteases detêm aproximadamente 60% do total de vendas, sendo 40% representado pelas proteases microbianas (Rao *et al.*, 1998).

Proteases fazem parte da classe de enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas em moléculas de proteínas. Constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais e apresentam uma

larga aplicação em diferentes processos industriais na indústria de alimentos, têxtil, farmacêutica, couro e detergentes (Phadare *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 1998). As proteinases destinadas a indústria de detergentes representa 30% do total da produção mundial de enzimas (Sandhya *et al.*, 2005; Tunga *et al.*, 2003).

As proteases são responsáveis pela grande aplicação dos fungos nos processos fermentativos. *Aspergillus oryzae* apresenta um papel importante ao longo dos anos na produção industrial de proteinases. Wang (2005) relata que inúmeros estudos foram publicados sobre informações genéticas do *Aspergillus oryzae* e caracterização de meios para produção de proteases. Diferentes



linhagens de *Aspergillus oryzae* produzem proteases ácida (Vishwanatha *et al.*, 2009), neutra (Sandhya *et al.*, 2005) e alcalina (Samarntarn *et al.*, 1999)

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as melhores condições de extração da protease microbiana do meio fermentativo, tendo a torta de canola como substrato. Para isto, avaliaram-se agitação, pH e volume do tampão de extração.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

A linhagem utilizada neste trabalho foi *Aspergillus oryzae* IV pertencentes a coleção de microrganismo do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical.

2.2 Preparação do inóculo

O microrganismo esporulado foi disperso com 40 ml de solução 0,3 % (p/v) de Tween 80 com auxílio de bastão estéril em condições assépticas. A concentração de esporos na suspensão obtida foi estimada pela contagem em microscópio usando Câmara de Neubauer após a devida diluição da suspensão obtida.

2.3 Fermentação semi-sólida

As fermentações foram realizadas com 40g de torta de canola umidificada em Erlenmeyers de 500 ml. Os frascos foram esterilizados a 121°C durante 15 minutos e inoculados com suspensão de esporos. O conteúdo foi homogeneizado. Os frascos foram incubados por 96 horas.

2.4 Efeitos dos parâmetros de processos

Diferentes variáveis de processos foram estudadas e observados seus efeitos sobre a produção da protease por fermentação semi-sólida. Variação da velocidade de agitação na etapa de extração enzimática, variação do volume do tampão de extração e variação do pH do tampão de extração (4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0), pH de determinação da atividade proteolítica (4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0).

2.4.1 Influência dos volumes de extrator

Para verificar a influência do aumento do volume do tampão de extração ao meio sólido utilizou diferentes volumes de extrator (100, 200 e 300 mL para cada 40g de meio fermentado) sendo 100 mL o volume controle. 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 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.

2.4.2 Agitação do meio enzimático na extração da enzima

O estudo das condições de extração envolveu a agitação do meio enzimático adicionado do tampão de extração, nesta etapa fez-se o controle (extração sem agitação) e o meio nas mesmas condições sob agitação (100 rpm) em Shaker orbital Tecnal-TE 420 durante 1 hora. 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.

2.4.3 Influência dos pH's de extração na atividade proteolítica

Para avaliar o efeito do pH do tampão de extração da enzima no meio sólido e da solução de azocaseína na determinação da



atividade enzimática utilizou-se tampão acetato 200 mM para os valores de pH 4,0 e 5,0, 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 nas faixas de pH: 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0.

2.4 Obtenção do extrato enzimático

A extração do complexo enzimático foi realizada pela adição de solução tampão acetato 200 mM aos meios fermentados e incubados a 30°C por 1 hora. O complexo enzimático foi obtido por filtração com papel qualitativo. O sobrenadante foi armazenado a temperatura de -18°C para análises.

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Influência do volume do extrator na atividade proteolítica

O estudo da adição de diferentes volumes de extrator ao meio semi-sólido é importante para observar o poder de observar

o poder de absorção do tampão pelo substrato e a determinação do volume necessário para a liberação da enzima presente no meio fermentado.

De acordo com a Figura 1 pode-se observar que o aumento do volume de extrator promoveu uma diminuição na recuperação da atividade proteolítica, a partir do meio sólido. Devido a enzima está mais concentrada no meio fermentado, o volume de 100 mL foi suficiente para a extração total da enzima, promovendo uma maior atividade proteásica. O uso de volumes de extrator a partir de 200 mL mostrou uma diminuição nos valores de atividade proteolítica recuperada total (Figura 1).

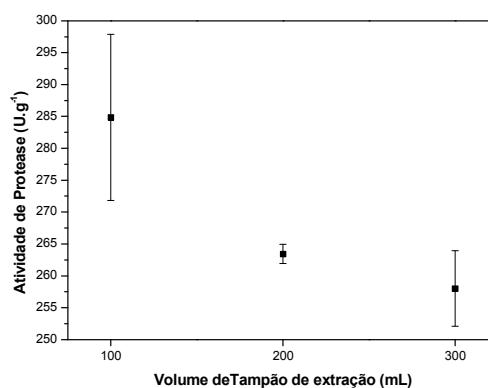


Figura 1 – Efeito da variação do volume de extrator enzimático (100, 200 e 300 mL) na determinação da atividade proteolítica do extrato enzimático.

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 100 mL de solução extratora para cada 40g de meio fermentado (razão de 2,5:1), visando à extração do



complexo enzimático de forma concentrada e eficiente, com conseqüente diminuição dos custos operacionais. Esse resultado mostra-se compatível ao relatado por Santos (2007), que estudando as condições de extração de poligalacturonase em fermentação semi-sólida.

3.2 Influência da agitação na extração da enzima

A agitação durante o período de extração enzimática é um fator importante podendo facilitar a liberação da enzima das partículas do meio sólido durante o processo de extração. Neste estudo a agitação da suspensão mostrou um aumento de 17 % sobre a recuperação da protease em relação ao controle (Figura 1). Porém em uma produção em larga escala deve-se levar em consideração os gastos adicionais com a energia utilizada para agitação e verificar se é viável ou não a adição da agitação durante o processo de extração.

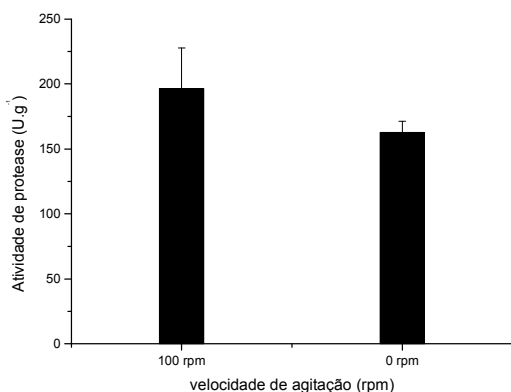


Figura 2 – Efeito da agitação do meio enzimático na determinação da atividade proteolítica do extrato enzimático.

3.3 Influência dos pH's de extração na atividade proteolítica

O pH do meio fermentativo influencia na afinidade da enzima com o substrato e no estado de ionização dos componentes

reacionais. As enzimas apresentam elevada atividade na faixa de pH em torno do seu pH ótimo. Neste trabalho todos os extratos enzimáticos obtidos utilizando-se soluções extratoras com diferentes pH's apresentaram atividade proteolítica nas faixas de pH utilizadas durante a análise. A interação entre as duas variáveis produziu diferentes respostas na atividade proteolítica. Os extratos enzimáticos obtidos com tampões pH 4,0 e 5,0, apresentaram valores inferiores de atividade em todas as faixas de pH de análise avaliadas quando comparadas aos obtidos com extratores de pH's 6,0; 7,0 e 8,0. O valor máximo de atividade proteolítica observado ocorreu quando tanto o pH da solução extratora quanto o pH de análise foi 7,0, atingindo 371 U.g⁻¹ (Figura 3).

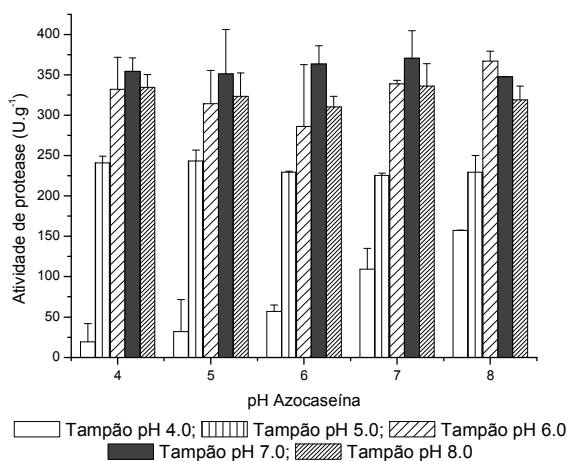


Figura 3 – Efeito da variação do pH da solução extratora e pH de análise na determinação da atividade proteolítica do extrato enzimático.

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 *Aspergillus 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 11,0. 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. 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.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram que na etapa de extração da enzima o aumento do volume de solução extratora ao meio semi-sólido não apresentou maior recuperação da enzima, sendo 100 mL o volume mais adequado, uma vez que nesta condição obteve-se os maiores valores de atividade enzimática (298 U.g⁻¹). A agitação dos meios a 100 rpm em 'Shaker' durante o período de extração enzimática contribuiu para um aumento de 17 % na recuperação da enzima do meio semi-sólido em relação ao controle. A combinação do pH do tampão de extração com o pH de análise na determinação da atividade proteolítica apresentou maiores valores de atividade de protease quando utilizou-se pH 7.0 tanto da solução extratora quanto o pH de análise.

5. REFERÊNCIAS

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

GHILDYAL, N. P., RAMAKRISHNA, M., LONSANE, B. K., KARANTH, N. G. 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, 1991.

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

PHADATARE, S. U.; DESHPANDE, V. V.; SRINIVASAN, M. C. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents. *Enzyme Microbiology Technology*. v.15, p. 72-76, 1993.

RAO, M. B. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, New York, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

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.

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

SAMARNTARN, W.; CHEEVADHANARAK, S. e TANTICHAROEN, M. Production of alkaline protease by a genetically engineered *Aspergillus oryzae* U1521. *Journal of*



General and Applied Microbiology, v. 45, n. 3, 99-103p. 1999.

SANDHYA C.; SUMANTHA A.; SZAKACS G.; PANDEY A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process Biochemistry. v.40, p.2689–2694, 2005.

TUNGA, R.; SHRIVASTAVA B.; BANERJEE R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. Process Biochemistry. v. 38, p. 1553–1558, 2003.

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

WANG, S.L., CHEN, Y.H., WANG, C.L., YEN, Y.H. AND CHERN, M.K. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. Enzyme and Microbial Technology, v. 36, p. 660–665, 2005.