

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Produção de Proteases por *Aspergillus niger* DPUA 399 em Fermentação Submersa

Ana Kezia Pimentel de Brito<sup>1</sup>, Laynah Pimenta<sup>1</sup>, Larissa Svetlana Cavalcante Silva<sup>2</sup>,  
Salomão da Rocha Martim<sup>2</sup>, Maria Francisca Simas Teixeira<sup>2</sup>, Ana Rita Gaia  
Machado<sup>2</sup>; Larissa de Souza Kirsch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Estado do Amazonas - Av. Djalma Batista, 2470, Chapada, Manaus-AM - E-mail:  
akpdb.bio@uea.edu.br

<sup>2</sup> Universidade Federal do Amazonas – Av. Rodrigo Otávio, 6200, Coroado, Manaus-AM

#### RESUMO

*Proteases têm uma grande importância na indústria e podem ser sintetizadas por fungos filamentosos por fermentação submersa. A eficiência do processo de produção depende de parâmetros físicos e químicos. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência do tipo e concentração de substrato e tempo de incubação na produção de proteases em fermentação submersa por *Aspergillus niger* DPUA 399. A produção de proteases foi realizada em solução salina suplementada com peptona, farelo de arroz ou gelatina a 0,2% ou 0,5% (p/v), pH 6, em 72 ou 144 horas. A espécie de *Aspergillus* neste estudo mostrou-se uma boa produtora de enzimas proteolíticas, porém não foi observada diferença significativa entre os cultivos. Este resultado infere que a substituição de substratos sintéticos por naturais e a diminuição do tempo de produção pode ser uma alternativa para reduzir os custos de produção.*

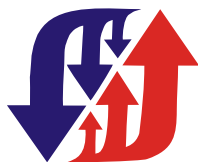
Palavras-chave: Enzimas, *Aspergillus*, Substrato Agroindustrial.

#### INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, proteases vêm ganhando enorme atenção por seu potencial em biotecnologia (Salgado et al., 2014). Tais enzimas fazem parte de um dos mais importantes grupos de biocatalisadores produzidos comercialmente e têm aplicação em diferentes indústrias, como: alimentícia, têxtil, farmacêutica e formulação de detergentes. Elas correspondem a mais de 60% de todo o mercado mundial de enzimas, sendo 40% de origem microbiana (Castro et al., 2015).

O gênero *Aspergillus*, encontrado no mundo inteiro, compreende cerca de 180 espécies reconhecidas e faz parte de um grupo de fungos anamorfos cuja maioria produz enzimas que catalisam a hidrólise de proteínas (Alecrim et al., 2012). Estas enzimas podem ser classificadas em: ácidas, neutras e alcalinas, quando ácidas são exploradas principalmente na indústria alimentícia, como material para tempero e coagulante na fabricação de queijos (Kalaskar et al., 2014).

A produção de proteases pode ser realizada através de fermentação semi-sólida e submersa. Esta última consiste na utilização de um substrato dissolvido ou suspenso em meio aquoso, cujos nutrientes estão disponíveis para o desenvolvimento do micro-organismo.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Algumas das vantagens desse processo fermentativo estão associadas à redução do tempo de produção, bem como na elevação na produtividade (Alecrim et al., 2012).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência do tipo e concentração do substrato indutor e tempo de incubação na produção de proteases por *Aspergillus niger* DPUA 399 em fermentação submersa.

### MATERIAL E MÉTODOS

*Aspergillus niger* (DPUA 399), preservado sob óleo mineral foi cedido pela Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas. O subcultivo foi preparado em ágar Czapek suplementado com Extrato de Levedura (CYA), em placas de Petri, mantido a 25 °C, por 7 dias.

Dos cultivos obtidos foi retirada massa micelial e adicionada em 5 mL de solução salina esterilizada para preparação da suspensão de esporos. Desta suspensão foi transferido um volume equivalente a 0,5% para 40 mL de solução salina [Fosfato de potássio monobásico 0,1% (p/v), sulfato de magnésio 0,5% (p/v), cloreto de sódio 0,5% (p/v) e sulfato ferroso 0,004% (p/v)], pH 6, suplementado, separadamente, com peptona, farelo de arroz e gelatina a 0,2% (p/v) e 0,5% (p/v). A fermentação submersa foi conduzida a 30° C, 180 rpm, por 72 e 144 horas. 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).

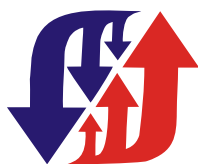
A atividade proteolítica foi determinada segundo Alecrim et al. (2015), onde 150 µL do extrato bruto foram adicionados a 250 µL de azocaseína 1% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2. A mistura foi incubada por 1 hora a 25 °C em câmara escura e interrompida pela adição de 1,2 mL de ácido tricloroacético 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 absorbância 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

Na fermentação submersa todos os cultivos se mostraram eficientes na produção de proteases, não havendo diferença significativa entre eles (Tabela 1). O tipo de substrato, bem como a diferença nas concentrações do substrato não influenciou diretamente na produção de enzimas proteolíticas. Este resultado mostra que o uso de substrato natural, como o farelo de arroz pode ser uma alternativa de baixo custo para produção destas enzimas, já que há o reaproveitamento do resíduo agroindustrial (Alecrim et al., 2012).

O tempo de incubação (72h ou 144h) também não foi um fator determinante na produção de proteases. Estudos mostram que a produção máxima de enzimas proteolíticas por espécies de *Aspergillus* ocorre entre 4 a 9 dias (Ire et al., 2011; Muthulakshmi et al., 2011). A



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

produção de proteases em tempo reduzido é um fator importante para as indústrias pois reduz os custos operacionais e uma menor degradação das enzimas produzidas (Nyonzima; More, 2013).

Tabela 1. Influência de diferentes parâmetros na produção de proteases por *Aspergillus niger* DPUA 399.

| Substrato       | Parâmetros       |           | pH final dos extratos | Atividade de proteases (U/mL) |
|-----------------|------------------|-----------|-----------------------|-------------------------------|
|                 | Concentração (%) | Tempo (h) |                       |                               |
| Peptona         | 0,5              | 144       | 5,0                   | 6.222 ± 0.77 <sup>a</sup>     |
| Peptona         | 0,5              | 72        | 5,5                   | 5.333 ± 0.66 <sup>a</sup>     |
| Peptona         | 0,2              | 144       | 5,5                   | 5.778 ± 0.38 <sup>a</sup>     |
| Peptona         | 0,2              | 72        | 5,5                   | 5.556 ± 0.38 <sup>a</sup>     |
| Gelatina        | 0,5              | 144       | 5,0                   | 5.778 ± 0.77 <sup>a</sup>     |
| Gelatina        | 0,5              | 72        | 5,5                   | 5.556 ± 0.38 <sup>a</sup>     |
| Gelatina        | 0,2              | 72        | 5,0                   | 5.556 ± 0.38 <sup>a</sup>     |
| Gelatina        | 0,2              | 144       | 5,5                   | 4.667 ± 0.66 <sup>a</sup>     |
| Farelo de Arroz | 0,5              | 72        | 5,0                   | 5.556 ± 0.38 <sup>a</sup>     |
| Farelo de Arroz | 0,5              | 144       | 4,5                   | 4.889 ± 0.77 <sup>a</sup>     |
| Farelo de arroz | 0,2              | 144       | 5,0                   | 5.778 ± 0.77 <sup>a</sup>     |
| Farelo de Arroz | 0,2              | 72        | 5,5                   | 4.889 ± 0.38 <sup>a</sup>     |

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

Ao final do processo fermentativo o pH dos extratos variou de 4,5 a 5,5. Este resultado está de acordo com Tichota et al. (2010), onde proteases coagulantes de *A. niger* expressaram atividade em pH 4,5, indicando que são produtores em potencial de enzimas que podem ser utilizadas na fabricação de queijo.

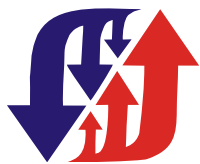
### CONCLUSÕES

*Aspergillus niger* DPUA 399 excretou proteases em todas as condições experimentais. Tanto os substratos sintéticos, quanto o farelo de arroz se mostraram eficientes para produção das enzimas em 72 ou 144 horas. Portanto, a substituição de substratos sintéticos por naturais e a diminuição do tempo de produção pode ser uma alternativa que contribua para redução nos custos do processo. Estudos complementares devem ser realizados para verificação de outros parâmetros que influenciem na otimização do processo de produção de enzimas proteolíticas.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alecrim MM, Lima HCR, Silva TA, Teixeira MFS, Oliveira IMA. 2012 Proteases de *Aspergillus flavo-furcatis* obtidas por fermentação submersa em meio sintético e natural. Disponível em: [www.sbpnet.org.br/livro/64ra/resumos/7090.htm](http://www.sbpnet.org.br/livro/64ra/resumos/7090.htm). Acessado em: 07 de Março de 2016.

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.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Castro RJS, Dias FFG, Sato HH, Ohara A, Nishide TG, Bagagli MP. 2015. A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. *Biocatal Agricul Biotechnol* 4:679-680

Ire FS, Okolo NBN, Moneke AN, Odibo FJC. 2011. Influence of cultivation conditions on the production of a protease from *Aspergillus carbonarius* using submerged fermentation. *Afr J Food Sci* 5:353-365.

Kalaskar VV, Kasinathan N, Subrahmanyam VM, Rao JV. 2014. Optimization of extracellular acid protease production from *Aspergillus niger* by factorial design. *J Microb Biotechnol Food Sci* 4:132-136.

Muthulakshmi CD, Gomathi DG, Kumar G, Ravikumar G, Kalaiselvi M, Uma C. 2011. Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. *JJBS* 4: 137-148.

Nyonzima FN, More SS. 2013. Screening and optimization of cultural parameters for an alkaline protease production by *Aspergillus terreus* gr. under submerged fermentation. *Int J Pharm Bio Sci* 4:1016 – 1028.

Salgado JM, Abrunhosa L, Venâncio A, Domínguez JM, Belo I. 2014. Screening of winery and olive mill wastes for lignocellulolytic enzyme production from *Aspergillus* species by solid-state fermentation. *Biomass Conv Bioref* 4:201–209.

Tichota DM, Lopes FC, Silva LAD, Brandelli A. 2010. Optimization of *Aspergillus niger* protease production (Otimização da produção de proteases de *Aspergillus niger*). XI Scientific Initiation. Pontificie Catholic University of Rio Grande do Sul-PUCRS.