

Síntese de proteases por uma espécie de fungo filamentoso anamórfico para aplicação em processo industrial

Synthesis of proteases by a species of anamorphic filamentous fungus for application in industrial processes

La síntesis de proteasas en una especie de hongo filamentoso anamórfico con aplicación en procesos industriales

Recebido: 25/11/2022 | Revisado: 08/12/2022 | Aceitado: 10/12/2022 | Publicado: 17/12/2022

Douglas Costa de Oliveira Filho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6811-3023>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: Douglas_filho07@hotmail.com

Kelven Wladie dos Santos Almeida Coelho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2665-1285>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: kelvenwladie@gmail.com

Victor Calebe Alves da Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0055-683X>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: victorcadcosta@gmail.com

Laynah Pimenta

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9962-0397>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: laynah.pimenta7@gmail.com

Elliza Emily Perrone Barbosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-2629>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: elliza.perrone01@gmail.com

Ana Kezia Pimentel de Brito

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7925-4908>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: anakeziapimentel@gmail.com

Samara Claudia Picanço Batista

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7430-6104>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: samara.claudia18@gmail.com

Romário da Silva Santana

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1775-9991>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: romariosantana15@gmail.com

Tiara Sousa Cabral

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0187-3498>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: ttiaara@gmail.com

Maria Francisca Simas Teixeira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0187-3498>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: mteixeira@ufam.edu.br

Resumo

O uso de enzimas no processamento de alimentos, detergente e no setor têxtil está em constante ascensão. A aplicação de enzimas proteolíticas de origem microbiana se destaca no setor industrial devido as condições desejáveis para uso em processos biotecnológicos, são biocatalisadores naturais e não tóxicos. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a produção e caracterizar as proteases sintetizadas por *Aspergillus flavus*. A cultura matriz foi preparada em ágar Sabouraud e mantida por sete dias a 25 °C. Em seguida, a espécie foi cultivada em meio líquido [GYP (glicose, extrato de levedura e peptona)]. A fermentação foi conduzida em agitador orbital 150 rpm, 25 °C. Após oito dias a massa micelial foi separada por filtração a vácuo em papel Whatman nº 1 e o extrato bruto recuperado, e filtrado em membrana polietersulfônica de 0,45µL. Para determinação da atividade das proteases foi utilizado como substrato azocaseína 1% (p/v) em tampão Tris-HCl pH 7.2. Os resultados mostraram que *A. flavus* excretou proteases em todos

nos meios testados, porém com atividade significativa no meio GYP (90,13 U/mL). As proteases apresentaram atividade ótima em pH 5 e temperatura 50°C. Esses resultados sugerem que essas enzimas podem ser utilizadas em diversos segmentos industriais, como alimentícia, têxtil e panificação.

Palavras-chave: Proteases; Fermentação submersa; Enzimas; Biotecnologia; Atividade proteolítica.

Abstract

The use of enzymes in food processing, detergent and textile industries is constantly on the rise. The application of proteolytic enzymes of microbial origin stands out in the industrial sector due to the desirable conditions for use in biotechnological processes, they are natural and non-toxic biocatalysts. The objective of this research was to evaluate the production and characterize proteases synthesized by *Aspergillus flavus*. The matrix culture was prepared in Sabouraud agar and kept for seven days at 25 °C. Then, the species was cultivated in liquid medium [GYP (glucose, yeast extract and peptone)]. The fermentation was conducted on an orbital shaker 150 rpm, 25 °C. After eight days the mycelial mass was separated by vacuum filtration on Whatman No. 1 paper and the crude extract recovered, and filtered on 0.45µL polyethersulfonic membrane. For determination of protease activity, 1% (w/v) azocasein in Tris-HCl buffer pH 7.2 was used as substrate. The results showed that *A. flavus* excreted proteases in all the media tested, but with significant activity in GYP medium (90.13 U/mL). The proteases showed optimum activity at pH 5 and temperature 50°C. These results suggest that these enzymes can be used in several industrial segments, such as food, textile and bakery.

Keywords: Proteases; Submerged fermentation; Enzymes; Biotechnology; Proteolytic activity.

Resumen

El uso de las enzimas para la elaboración de alimentos, detergentes y en el sector textil está en constante expansión. La aplicación de las enzimas proteolíticas de origen microbiano gana destaque en el sector industrial porque ofrecen condiciones deseables para su aplicación biotecnológica, pues son biocatalizadores naturales y no tóxicos. El objetivo de este estudio fue analizar la producción y caracterizar las proteasas sintetizadas por *Aspergillus flavus*. El preparo para la matriz del cultivo, fue con el uso de agar Sabouraud y se ha mantenido a 25°C por siete días. Luego, se cultivó la especie en medio líquido [GYP (glucosa, extracto de levadura y peptona)]. Después de ocho días, la masa micelial fue separada por filtración a vacío con compresor, en papel Whatman n.1 y se recuperó el extracto crudo, por una membrana polietersulfónica de 0,45µL. Para la determinación de las proteasas, se utilizó azocaseína al 1% (p/v) como sustrato, en solución tampón Tris-HCl de pH 7,2. Los resultados indicaron que *A. flavus* fue capaz de excretar proteasas en todas las condiciones testadas, pero con actividad significativa en medio líquido GYP, con 90,13 U/mL. las proteasas presentaron una actividad ideal a un pH 5,0 y temperatura a 50°C. Estos resultados demuestran que estas enzimas pueden ser utilizadas en diversos sectores industriales, como el de la alimentación, el de la textil y en de la panificación.

Palabras clave: Proteasas; Fermentación en estado líquido; Enzimas; Biotecnología; Actividad proteolítica.

1. Introdução

Aspergillus são fungos filamentosos anamórficos que apresentam distribuição cosmopolita, representados, aproximadamente por 340 espécies, apresentam uma diversidade de hábitos, como saprofitismo, são oportunistas, podem causar patologias em plantas e animais, todavia diversas espécies sintetizam compostos bioativos de importância industrial. Entre esses biocompostos, as enzimas têm predominado no mercado mundial, com destaque para as proteases (De vries et al., 2017; Osmolovskiy et al., 2021; Silva neto et. al. 2020).

Proteases são enzimas que catalisam reações hidrolíticas, degradam proteínas em peptídeos e aminoácidos. Existe um crescente interesse por essas enzimas devido à possibilidade de aplicação industrial e consequente valor econômico. Correspondem a aproximadamente 60% do mercado mundial de enzimas industriais, a exemplo de peptidases alcalinas (25%), tripsinas (3%), reninas (10%) e outras proteases (21%) (Santos et al., 2016; Barbosa et al., 2020)

Enzimas proteolíticas podem ser obtidas por meio de fontes animais, vegetais e com destaque os microrganismos. Entre os microrganismos, os fungos estão despontando em bioprocessos para aplicação industrial, visto que tem capacidade de cultivo em grande escala, diversidade bioquímica, apresentam características fisiológicas e tecnológicas desejáveis para produção desses biocatalisadores. As proteases têm várias aplicações, na indústria têxtil, farmacêutica, alimentos, detergente e podem ser produzidas pela tecnologia da fermentação (Brito et al., 2019).

A tecnologia da fermentação submersa (FSS) é a mais utilizada para a produção das proteases de maneira viável e segura, consiste no crescimento em meio de cultura líquido suficiente para promover e sustentar o desenvolvimento do microrganismo. É o processo utilizado nos segmentos industriais para obtenção desses metabólitos, pois têm facilidade de avaliar e monitorar parâmetros físico-químicos (pH, temperatura e aeração). Além disso, diminui o tempo do processo, eleva a produtividade e facilita a recuperação dessas enzimas (Santos et al., 2016; Pimenta et al., 2021).

Muitas enzimas produzidas por cepas fúngicas já foram isoladas, todavia ainda há uma diversidade de espécies que permanecem inexplorada (Naeem et al., 2022). Com base na importância do uso fungos como fonte de enzimas, este estudo avaliou a produção de proteases por *Aspergillus flavus* para investigação das características para posterior aplicação industrial.

2. Metodologia

2.1 Microrganismo

Neste estudo foi utilizado *Aspergillus flavus* DPUA 1814, cedido do acervo da Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Para obtenção da cultura viável, a espécie foi cultivada em placas de Petri contendo ágar Sabouraud e mantida a 25 °C por oito dias para posterior utilização nos experimentos (PRADO *et al.*, 2021).

2.2 Autenticação da espécie com base nas características morfológicas

Para autenticação da linhagem, o fungo *A. flavus* foi cultivado em ágar Czapek (CZ), ágar Czapek Levedura Autolisado (CYA) e ágar Sabouraud. As placas foram incubadas a 25 °C por oito dias e após o período de incubação, as características macroscópicas das colônias, como: diâmetro, coloração, textura, topografia, difusão de pigmento e presença de exsudato foram coletadas (Prado et al., 2021).

2.3 Determinação qualitativa da atividade proteolítica

Para determinação da atividade de proteases foi utilizado o extrato bruto e discos miceliais. No procedimento para determinação da atividade de proteases utilizando discos miceliais, foram retirados da cultura teste três discos miceliais de 8mm, e inoculados na superfície do ágar leite. Para o procedimento de determinação da atividade das proteases utilizando extrato bruto, retirou-se 100µl do extrato enzimático e foram feitos “cup plates” de 8 mm de diâmetro do ágar para inoculação. Os cultivos foram mantidos a 25 °C por 7 dias. A produção das enzimas foi observada pela formação dos halos enzimáticos, os quais foram medidos em seu diâmetro e os resultados expressos em mm. Para a determinação do Índice de Atividade Enzimática (IAE), utilizou-se a equação abaixo, conforme descrita em Teixeira et al. (2011):

$$I = \text{diâmetro do halo (mm)} / \text{diâmetro do poço (mm)}$$

O microrganismo é considerado como um bom produtor de enzimas em meio sólido quando o valor do IAE é maior ou igual a 2,0 (Teixeira et al., 2011).

2.4 Fermentação submersa

No cultivo em meio líquido, discos miceliais do cultivo em ágar Sabouraud foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio líquido, GYP (glicose, extrato de levedura e peptona). Os frascos foram mantidos em agitador orbital, a 150 rpm, 30 °C por sete dias. Após o período de incubação, a biomassa foi separada por filtração à vácuo em papel de filtro. Para determinação da atividade enzimática os extratos foram submetidos a filtração em filtros de membrana polietersulfônica de 0,45µ (Prado et al., 2021).

2.5 Determinação quantitativa da atividade proteolítica

O método utilizado para quantificação das enzimas proteolíticas no extrato bruto foi executado conforme por Prado et al. (2021). Na mistura reacional foi utilizado 250 µl do substrato (azocaseína 1,0% p/v em Solução Tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6) e 150µL do extrato bruto recuperado da fermentação submersa. Essa mistura foi incubada durante 60 minutos a 25 °C, em ausência de luz, incluindo o branco. A reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de ácido tricloroacético 10 % p/v, seguida de centrifugação por 10 minutos a 8000 xg, a 4°C. Em seguida, 800 µl do extrato recuperado foram transferidos para tubos de ensaio contendo 1,4 mL de hidróxido de sódio 1 M. A leitura foi realizada a 440 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Uma unidade de protease foi definida como a quantidade necessária para promover variação de absorbância igual a 0,1 por minuto durante 60 minutos e expressa em U/mL (Prado et al., 2021).

2.6 Determinação do efeito do pH e temperatura ótima na atividade proteolítica

Para determinação do efeito do pH na atividade proteolítica, foi utilizada solução de azocaseína 1,0 % (p/v) diluída em tampão Acetato de Sódio (pH 5,0 e 6,0), Tris-HCl (pH 7,0 e 8,0) e Glicina-NaOH (pH 9,0 e 10). O efeito da temperatura foi realizado nas temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70 °C. A determinação do efeito do pH e temperatura foram processadas conforme o item 2.5 (Pimenta et al., 2021).

2.7 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva média, desvio padrão, gráficos e os cálculos de atividade enzimática ($R^2 \geq 95\%$) por análise de variância (Anova) e teste Tukey ($p < 0,05$) para comparação de médias, utilizando o software Minitab ® versão 17.0 (Pimenta et al., 2021).

3. Resultados e Discussão

Os resultados do processo de autenticação de *A. flavus* DPUA 1814 com base nas características morfológicas comprovaram a viabilidade característica da espécie (Raper e Fennell, 1977). Prado et al. (2017) verificaram a viabilidade de *A. flavus*, ao analisar culturas diferentes espécies de representantes do gênero *Aspergillus* preservadas em água destilada e óleo mineral.

Nas condições testadas, *A. flavus* excretou proteases tanto na avaliação da atividade qualitativa, quanto técnicas de blocos de gelose e perfuração por poços, revelando valores de halo, em média, igual a 21,5 mm e 19 mm respectivamente. A técnica do bloco de gelose mostrou-se mais eficaz em 11% quando comparada a outra técnica, com índice de atividade enzimática, maior que 2,5, o que é considerado eficiente produtor de enzimas (Teixeira et al., 2011; Neto et al., 2020)

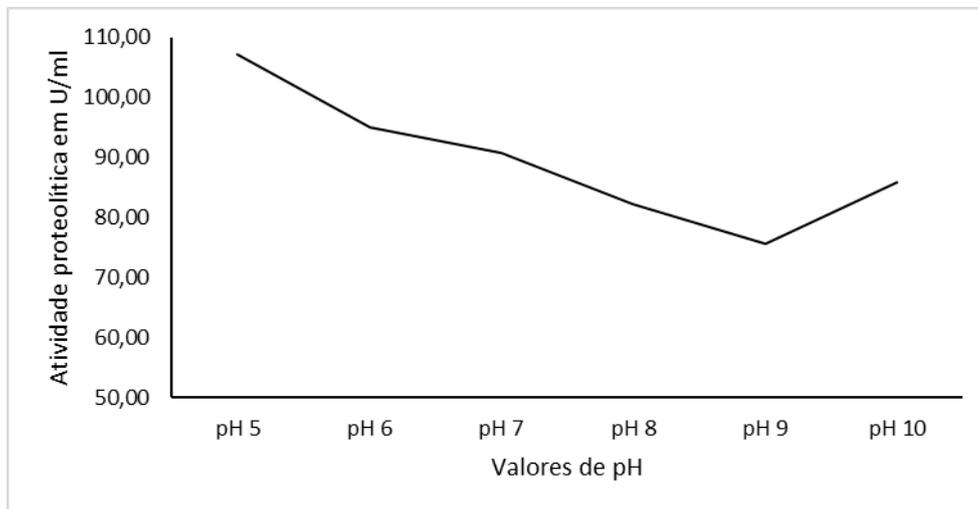
Quando utilizado azocaseína como substrato, foi possível verificar 90,13 U/mL, respectivamente. Em estudos com diferentes espécies de *Aspergillus*, foi observado valores inferiores (Chimbekujwo et al., 2020). *Aspergillus flavus* é uma espécie que já foi demonstrada como promissora na produção de proteases (Omolehin et al., 2021).

As capacidades catalíticas das enzimas proteolíticas variam de acordo com muitos fatores, como por exemplo, a linhagem, bioprocessos para obtenção da enzima, tipo de substrato proteico que pode inibir ou estimular a síntese proteica. Além disso, o microrganismo pode excretar proteases que não são capazes de degradar as proteínas presentes no meio de cultivo e isso pode variação de resultados de um estudo para o outro (Coelho et al., 2018).

O efeito do pH na atividade de proteases de *A. flavus* está demonstrado na figura 1. Foi possível observar que houve a excreção de proteases em todos os pH testados. A atividade significativa foi obtida, em média em pH 5, com decréscimo de atividade em pH alcalino, apresentando somente 14% da atividade catalítica. No entanto houve um aumento de 20% em pH 10.

Extratos que possuem essas características mostra que pH pode ser influenciado por diversos fatores, pelo tipo de solução, concentração do meio de cultura e a presença de agente redutores (Barbosa et al., 2020).

Figura 1 - Efeito do pH ótimo de proteases de *Aspergillus flavus*.

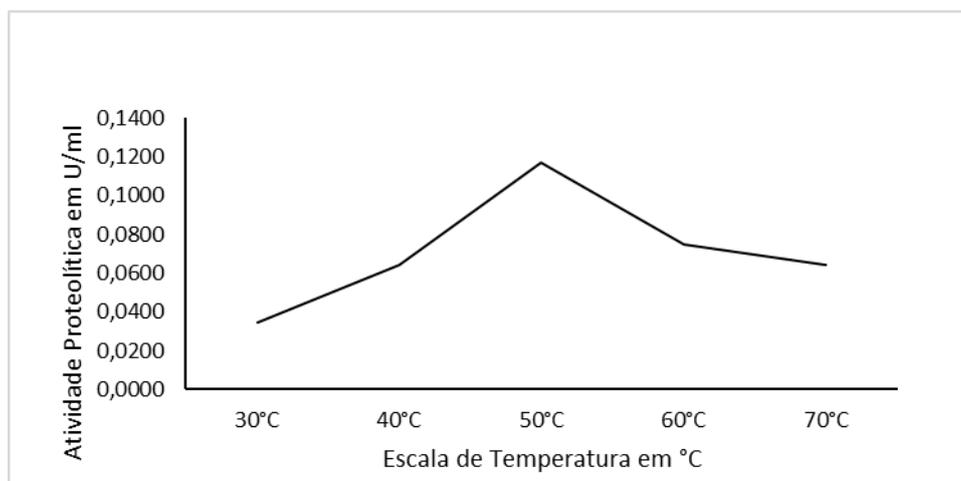


Fonte: Autores.

Resultado similar foi descrito por Prado et al., 2021 para proteases de *A. oryzae*, onde verificaram condições ótimas em condições de cultivo submerso. Proteases ácidas ou levemente ácidas podem ter aplicação em vários segmentos industriais, como na indústria alimentícia na produção de molhos, hidrolisados proteicos, clarificação de sucos e cerveja, amaciamento de carnes e massas a base de trigo, na produção de queijo (Vishwanatha et al., 2010, Damare et al., 2020).

A Figura 2 ilustra o efeito da temperatura na atividade de proteases em condições ótimas. Foi possível observar que houve a excreção de proteases em todas as temperaturas testadas. No entanto, os dados revelaram que a atividade significativa foi determinada a 50 °C, onde houve redução de atividade com o aumento da temperatura.

Figura 2 - Efeito da temperatura ótima de proteases de *Aspergillus flavus*.



Fonte: Autores.

Resultados similares foram descritos por Salihi et al. (2017) e Prado et al., (2021) para as proteases de *A. oryzae* CH93 e *A. oryzae* DPUA 541. A temperatura é um parâmetro essencial para a atividade das enzimas, a taxa da ação enzimática aumenta com a temperatura pelo aumento da colisão de moléculas e da energia de ativação (BANO et al. 2019). A produção de

proteases pode ser otimizada por influência de vários fatores que estão presentes nos bioprocessos, e a temperatura influencia diretamente na atividade enzimática (Braga et al., 2020; Zamani et al., 2021).

4. Considerações Finais

Os resultados obtidos demonstraram a eficiência de *A. flavus* como fonte de protease. Estas enzimas expressam atividade ótima em pH 5 a 50 °C. Essas características sugerem que *A. flavus* tem potencial para uso na indústria farmacêutica, têxtil, alimentícia, química e principalmente, na indústria alimentícia pelas características apresentadas, evidenciando que a espécie nessas condições pode ajudar no processo de fabricação de laticínios.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Amazonas (FAPEAM) e à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pelo apoio técnico, científico e financeiro.

Referências

- Bano, S. et al. (2019). Characterization of crude protease produced by *Pleurotus eryngii* ATCC 90888. *Pak. J. Biotechnol.* 13, 193-198.
- Barbosa, E. E. P., Pimenta, L., Brito, A. K.P., Martim, S. R. & Teixeira, M. F. S. (2020). Cultivo de cogumelo comestível em resíduos lignocelulósicos de floresta tropical para produção de proteases. *Brazilian Journal of Development.* 6(11), 92475-92485.
- Braga, R. S. et al. (2020). *Lentinus villosus* Klotzsch (1833) AM 169: a natural and renewable source of alkaline protease. *Braz. J. of Develop.* 6(11), 85867-85883.
- Brito, E. C. M., Braga, R. S., Teixeira, M. F. S. & Martim, S. R. (2019). Produção e caracterização parcial proteases aspárticas sintetizadas por *Lentinus crinitus* (L.) Fr.1825 DPUA 1693 (Polyporaceae). *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.*, 14(3), 463-472.
- Chimbekujwo, K. I., Já' afaru, M. I. & Adeyemo, O. M. (2020). Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. *Scientific African.* 8(1).
- Coelho, G. D., Sousa, J. P., Lima, C. A., & DA Silva Lins, S. A. (2018). Potencial de fungos da Caatinga para produção de enzimas amilolíticas. *Revista Saúde & Ciência Online.* 7(2), 286-297.
- Damare, S., Mishra, A., D'souza-ticlo-diniz, D., Krishnaswamy, K. & Raghukumar, C. (2020). A deep-sea hydrogen peroxide-stable alkaline serine protease from *Aspergillus favus*. *Biotech.* 10(528).
- Hawksworth, David L. & Lücking, R. (2017). *Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. Microbiology spectrum,* 5(4), 5-4.2017.
- Inácio, f. d. et al. (2013). Produção de Protease e Lacase por Basidiomicetos. *Biochemistry and Biotechnology Reports. Número Especial.* 2(3), 359-362.
- Liu, X., & Kokare, C. (2017). Microbial Enzymes of Use in Industry. *Biotechnology of Microbial Enzymes.* 267-298.
- Neto, R. F., Silva, T. D., Abrão, F.O., Ferreira, J. C., Batista, L. H. C., Silva, B. C., Viera, R. I. M. & Miyage, E. S. (2020). Avaliação in vitro de fungos ruminais como probiótico para ovinos em dieta de alto grão. *Brazilian Journal of Development.* 6(7), 53642-53656.
- Omolehin, O., Ruarung, Y., Hu, U., Han, Z.O., Wei, O., Wang, K., Rajasekaran, K., Cary, J.W. & Chen, Z. Y. (2021). Resistance to Aflatoxin Accumulation in Maize Mediated by Host-Induced Silencing of the *Aspergillus flavus* Alkaline Protease (alk) Gene. *Journal of fungi.* 7(904).
- Osmolovskiy, A. A., Schmidt, L., Orekhova, A. V., Komarevtsev, S. K., Kreyer, V. G., Shabunin, S. V. & Egorov, N. S. (2021). Action of Extracellular Proteases of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus* Micromycetes on Plasma Hemostasis Proteins. *Life.* 11(782).
- Naeem, M., Manzoor, S., Abid, M.-u.-H., Tareen, M. B. K., Asad, M., Mushtaq, S., Ehsan, N., Amna, D., Xu, B. & Hazafa, A. (2022). Fungal Proteases as Emerging Biocatalysts to Meet the Current Challenges and Recent Developments in Biomedical Therapies: An Updated Review. *J. Fungi,* 8(109).
- Pimenta, L. Barbosa, E. E. P., Brito, A. P., Martim, S. R. & Teixeira, M. F. S. (2021). Processo eco-amigável para selecionar substrato Lignocelulósico para produção de peptidases ácidas. *Brazilian Journal of Development.* 7(1), 3469-3479.
- Prado, F.B., Batista, S. C. B., Martim, S. R. & Teixeira, M. F.S. (2021). Viabilidade da produção de proteases por espécies de Aspergillaceae e triagem de coagulantes do leite bovino. *Brazilian of Development.* 7(2), 16356-16373.
- Raper, K. B. & Fennell, D.I. (1977). "The Genus *Aspergillus*," Krieger Publishing Company.
- Salihi, A., Assodeh, A. & Aliabadian, M. (2017). Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillusoryzae* CH93. *International Journal of Biological Macromolecules,* 94, 827-835.

Santos, A. F., Gandra, M. R., Oliveira, S. S. C., Kneip, L. F., D'ávila-levy., C. M., Branquinha, M. H. & Santos, A. L.S. (2016). Peptidases em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria*. Editora Edgard Blücher Ltda.

Silva neto, B. R. (2020). (Organizador). *Micologia (recurso eletrônico): fungos e/ou seus metabólitos como objeto de estudo*. Editora Atena. 64-96.

Teixeira, M.F.S., Silva, T.A., Palheta, R. A., Carneiro, A.L.B. & Atayde, H.M. (2011). Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (Aplicações biotecnológicas). Manaus. *Edua*.

Vishwanatha, KS, Appu rao, AG & Singh, S.A. (2010). Produção e caracterização de uma enzima de coagulação do leite de *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 1849–1859.

De vries, R.P., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-osorio, G., Amillis, S., Uchima, C.A., Anderluh, G., Asadollahi, M., Askin, M. & Barry, K. (2017). Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrial and medicaly important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biol.* 18(1), 1–45.

Zamani, E., Zargan, J., Honari, H., Hajizade, A., Mohammadi, A. H. N., Alikhani, H. K. & Pour, M. H. (2021). Immunological detection of AcAMP antimicrobial peptide secreted by *Aspergillus clavatus*. *Iranian Journal of Microbiology*, 13(2), 235.