

## **Produção de proteases por *Aspergillus* spp estocados na Coleção de Fungos da Amazônia - CFAM do Instituto Leônidas e Maria Deane**

Araújo CPM<sup>1,2</sup>, Silva LM<sup>1,2</sup>, Lima AKS<sup>1</sup>, Torres DR<sup>1</sup>, Silva JC<sup>1</sup>, Fernandes OCC<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD/FIOCRUZ, Manaus - AM. <sup>2</sup>Faculdade Estácio do Amazonas, Manaus – AM. Email: ofernandes@amazonia.fiocruz.br

### **Resumo**

O aproveitamento de fontes naturais, como microrganismos, para produção de novos bio-produtos vem sendo o principal incentivo para o desenvolvimento de diversos setores da indústria. As proteases de *Aspergillus* spp. são largamente exploradas em diversas indústrias devido à sua atividade em vários pH e temperaturas. Para o presente estudo foram selecionadas 11 amostras de *Aspergillus* da Coleção de Fungos da Amazônia- CFAM/FIOCRUZ –AMAZÔNIA, com o objetivo de encontrar cepas produtores de protease. As culturas foram reativadas e autenticadas mantendo assim suas características morfológicas e fisiológicas para todas as amostras viáveis. Quanto a atividade proteolítica qualitativa observou-se que todos os isolados de *Aspergillus* apresentaram positividade para produção de proteases, como também apresentaram bons índices enzimáticos destacando-se *Aspergillus japonicus* (CFAM 0240) com 7 mm de halo ao redor do “cup plate”. A atividade proteolítica variou entre os indivíduos da mesma espécie, sendo estes capazes de degradar a caseína presente no meio sólido. Já na avaliação quantitativa observamos que houve uma variação da atividade proteolítica, com valores variando de 8,09 U/ml (*A. japonicus* CFAM 0240) a 22,49 U/ml (*A. oryzae* CFAM 0540), o que demonstra que a produção de proteases pode variar entre fungos de espécies diferentes. Esse estudo contribuiu para que futuramente a importação de enzimas para o Brasil não seja uma necessidade e sim, mais uma opção, tendo em vista que microrganismos oriundos da região amazônica apresentam potencial para produção enzimática.

**Palavras-chave:** *Aspergillus*, Fungos, Proteases microbianas.

## Introdução

O aproveitamento de fontes naturais, como microrganismos, para produção de novos bio-produtos vem sendo o principal incentivo para o desenvolvimento de diversos setores da indústria. A biodiversidade do Brasil apresenta grande potencial para a busca de novos fármacos e biomarcadores enzimáticos, disponível para transformação em produtos úteis e de maior valor agregado, dentre eles as enzimas (Zimmer *et al.*, 2009).

As proteases estão classificadas dentro do grupo das hidrolases, estas correspondem à aproximadamente 75% das enzimas industriais, sendo 65% das enzimas comercializadas mundialmente representadas por aquelas que degradam proteínas (Yin *et al.*, 2014). Embora as enzimas mais estudadas sejam de origem animal e vegetal, as enzimas de origem microbiana surgem como uma alternativa mais simples e barata, correspondendo a 90% das proteases comercializadas (Inácio *et al.*, 2014).

Os microrganismos representam uma excelente fonte de proteases devido a sua grande diversidade bioquímica, requerem espaço limitado para cultivo e são susceptíveis à manipulação genética (Bon *et al.*, 2008). Os fungos são uma das principais fontes desta enzima, estes a secretam para o meio externo com a finalidade de degradar as proteínas cujos produtos desta hidrólise servem como fonte de nutrientes para o processo de multiplicação celular.

As proteases de *Aspergillus* spp. são largamente exploradas em diversas indústrias devido à sua atividade em vários pH e temperaturas (Haq, 2006). Algumas espécies deste gênero apresentam a capacidade de produzir proteases neutras, ácidas e alcalinas, como é o caso de *Aspergillus oryzae* (Inácio, 2014; Said & Pietro, 2004).

A relevância deste grupo de enzimas rica em diversidade estrutural e mecanismos de ação se refletem na importância das suas aplicações em processos industriais, tais como, proteases utilizadas em detergentes que precisam ter estabilidade em ampla gama de pH e em altas temperaturas, bem como compatibilidade com agentes oxidantes (Sumantha, 2006).

Para obtenção destas enzimas pode-se utilizar dois métodos, a fermentação submersa e a fermentação em estado sólido. Na fermentação submersa a cultura a ser utilizada é cultivada em frascos contendo meio de crescimento e mantidos em agitação até atingir a fase de crescimento exponencial. Este tipo de fermentação é bastante utilizado devido a facilidade de crescimento dos micro-organismos em

condições controladas de pH e temperatura, além de tornar fácil a recuperação das enzimas extracelulares (Feitosa, 2009).

Portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de *Aspergillus* spp. quanto à produção de proteases.

## **Material e métodos**

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram testadas 11 amostras de fungos filamentosos, estocados na Coleção de Fungos da Amazônia - CFAM. Este trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório multiusuário em saúde/Micologia do Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ Amazônia.

### *Reativação das culturas preservadas*

As culturas fúngicas foram repicadas em placas de Petri contendo o meio de cultura Extrato de Malte- Ágar (MEA) e mantidos à 28 °C, em incubadora tipo BOD, durante sete dias, para reativação, verificação da pureza e realização dos testes.

### *Condições de cultivo para produção de enzima*

Os testes foram realizados segundo a metodologia descrita por Manachini *et al.* (1987). Inicialmente, 1mL da suspensão de esporos na concentração de  $5 \times 10^6$  dos isolados serão transferidos para frascos erlenmeyer contendo 30mL da solução de Manachini suplementado com gelatina à 0,5% com a finalidade de estimular a secreção da enzima em questão. Esses meios foram mantidos à 120 rpm por 96 horas a 28 °C em agitador orbital. Após esse período, a massa micelial foi separada do extrato enzimático por filtração a vácuo em sistema de milipore, e o filtrado obtido foi utilizado nos testes de atividade enzimática. Cada isolado foi individualmente testado para secreção de proteases.

### *Avaliação qualitativa em meio sólido*

Após o período de crescimento celular e separação da massa micelial, aproximadamente 150 µL dos extratos enzimáticos foram inoculados nas placas de Petri contendo o meio ágar gelatina à 5% suplementado com leite desnatado à 5%, onde foram feitas perfurações circulares (técnica de “cup plate”), com diâmetro de 1cm. As

placas foram incubadas em estufa a 28 °C por 18 a 24 horas. Os extratos enzimáticos foram avaliados qualitativamente, onde a produção enzimática foi avaliada pela formação de halos determinados em mm. Não foi necessária adição de revelador, uma vez que a hidrólise da caseína do leite pode ser percebida, pelo halo incolor, ao redor do ponto de aplicação do filtrado.

#### *Determinação da Atividade de proteolítica*

A atividade de protease foi determinada utilizando-se caseína como substrato, como descrito por Fleuri & Sato (2008). A mistura de reação contendo 1,5 mL de solução 2,0% de caseína; 1,0 mL de tampão fosfato 0,15 M, pH 7,5 e 0,5 mL de solução enzimática foi incubada a 30 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 3,0 mL de solução a 0,4 M de ácido tricloroacético (TCA), seguida de centrifugação refrigerada por 15 minutos a 4000 rpm. A absorbância do filtrado foi determinada a 280 nm, sendo uma unidade de atividade definida como aquela capaz de aumentar em uma unidade a absorbância do filtrado, nas condições do ensaio. Foi preparado um tubo branco para cada amostra, com a adição de TCA antes da adição da enzima. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (Fleuri & Sato 2008).

### **Resultados**

Durante o processo de reativação e autenticação nos 11 isolados de *Aspergillus* spp. em meio Extrato de Malte-Ágar (MEA) estocados na Coleção de Fungos da Amazônia-CFAM, foi possível observar suas características morfológicas e fisiológicas, como a coloração e tamanho da colônia, textura e tamanho de conídios e conidióforos. Verificou-se que 100% dos isolados mantiveram suas características morfofisiológicas após o período de 11 a 15 anos de conservação em água destilada.

Quanto aos resultados obtidos acerca da atividade proteolítica pela técnica de “cup plate” (protease qualitativa) foi possível observar que todos os isolados apresentaram halos translúcidos ao redor do “cup plate”, com diâmetros variando de 1 a 7 mm, o que indicam bons índices enzimáticos para a enzima testada, destacando-se o isolado *Aspergillus niger* (CFAM, 0240) com 7 mm. Observou-se que a atividade proteolítica variou entre os indivíduos da mesma espécie, sendo estes capazes de degradar a caseína presente no meio sólido. Características de produção de proteases por esses isolados também similares aos obtidos em estudos realizados por Yadav

(2015), que caracterizou uma serina protease alcalina obtida a partir de *A. flavus* (MTCC 9952).

Já na avaliação quantitativa observamos que houve uma variação da atividade proteolítica, com valores variando de 8,09 U/ml (*A. japonicus* CFAM 0240) a 22,49 U/ml (*A. oryzae* CFAM 0540), o que demonstra que a produção de proteases pode variar entre fungos de espécies diferentes, em que algumas se destacam em relação às outras (figura 1).

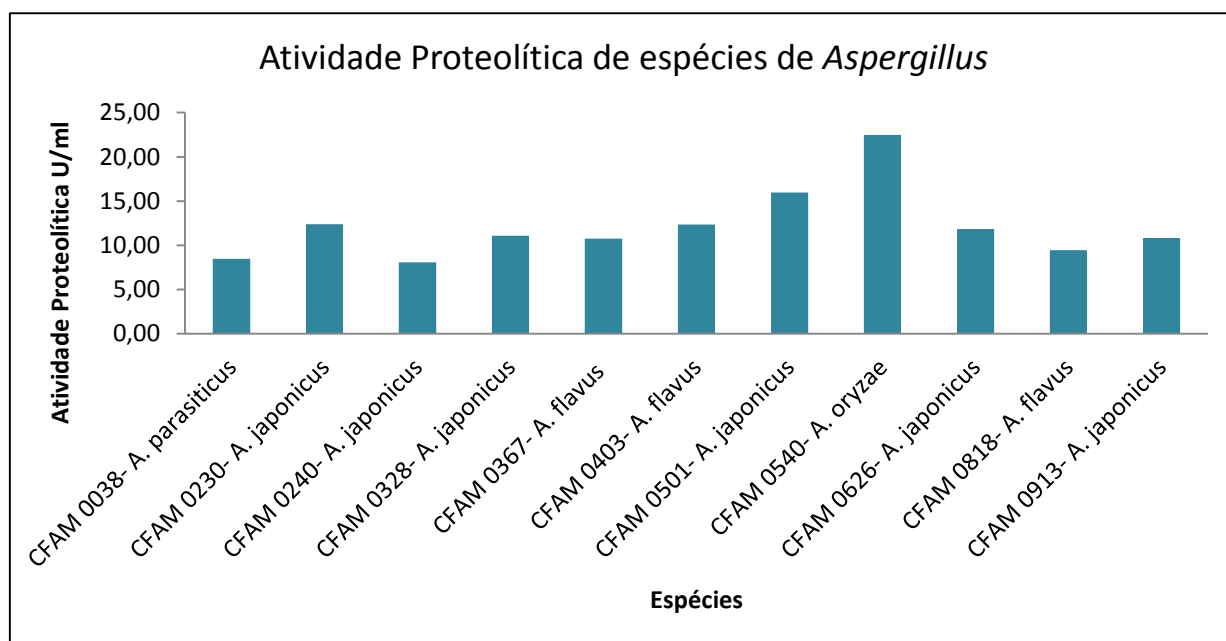


Figura 1. Atividade proteolítica (U/mL) de *Aspergillus* spp. por fermentação submersa

## Discussão

Os resultados obtidos em nossos estudos acerca da autenticação mostraram que as culturas estudadas mantiveram as suas características peculiares de acordo com Monteiro (2012), que também avaliou as características macro e micromorfológicas do gênero *Aspergillus* spp, sendo que estes foram isolados de solo preservado do cerrado. Provavelmente, a predominância da viabilidade das culturas esteja relacionada à ausência de subcultivo, a idade do inóculo e à permanência do micélio em estado de latência, condições as quais auxiliam na diminuição de mutações (Silva *et al.*, 2010).

Com base na análise proteolítica qualitativa nota-se que *Aspergillus* é um produtor significativo da enzima estudada, sendo estas muito utilizadas na indústria, devido apresentarem atividade em uma ampla faixa de pH e temperatura e uma única espécie pode produzir proteases neutras, ácidas ou alcalinas, como é o caso de *Aspergillus oryzae* (Inácio, 2014; Said e Pietro, 2004).

Nos dados quantitativos, o valor máximo de atividade proteolítica foi observado em *A. oryzae* CFAM 0540: 22,49 U/ml, valore, acima dos encontrados por Murthy & Kusumoto (2015) que avaliaram a produção de proteases na espécie de *A. oryzae* RIB40 (ATCC 42149) em fermentação em estado sólido utilizando pó de polpa de batata como substrato. Em outro estudo feito por Shirasaka *et al.* (2012), ao avaliar a espécie *A. oryzae* KSK-3 obtiveram produção de proteases de 2,96 U/ml, este foi submetido à fermentação em meio GYP, onde a protease encontrada apresentou ação fibrinolítica e indicada para tratamento fibrinolítico de uso oral e aplicações nutraceuticas. Isso demonstra que a atividade proteolítica pode variar entre fungos da mesma espécie, dependendo da metodologia e condições de cultivo utilizadas.

## Conclusão

O Brasil, hoje, é um país essencialmente importador de enzimas, além de apresentar um uso ainda reduzido de enzimas em processos industriais quando comparado com outros países. Assim, a inserção e consolidação do Brasil como produtor de tecnologia enzimática faz-se necessário. Estudos como este contribuem para opção de obtenção de enzimas de cepas de *Aspergillus* oriundas da região amazônica e que futuramente poderão ser alternativa às enzimas importadas.

## Referências

- Bon EPS, Ferrara MA, Carmo ML (2008) Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro: *Interciencia*: 433-488.
- Feitosa IC (2009) Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa. Sergipe, Brasil, 104p. (Dissertação), Mestrado em Engenharia de processos, Universidade Tiradentes.
- Fleuri LF, Sato HH (2008) Study of different parameters in the production of Lytic enzymes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28: 299-310.
- Haq IU, Mukhtari H, Umber H (2006) Production of protease by *Penicillium chrysogenum* through optimization of environmental conditions. *J. Agricult. Soc. Sci.* 2:23-25.
- Inácio FD, Ferreira RO, Araujo CAV, Brugnari T, Castoldi R, Peralta RM, Souza CGM (2014) Proteases of wood rot fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. *Biomed Research International*. 1-10.
- Manachini PL, Fortina MG, Parini C (1987) Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters* 9: 219-224.
- Monteiro MCP (2012) Identificação de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado. Minas gerais, Brasil, 76p. (Dissertação) Mestrado em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Lavras, UFLA.
- Murthy PS, Kusumoto Ken-Ichi (2015) Acid protease production by *Aspergillus oryzae* on potato pulp powder with emphasis on glycine releasing activity: A benefit to the food industry. *Food and Bioprocess Technology*. 96: 180-186.
- Said D, Pietro RCLR (2004) Enzimas como agentes biotecnológicos. *Legis Summa*, Ribeirão Preto, Brasil. 412p.
- Shirasaka N, Naitou N, Okamura K, Kusuda M, Fukuta Y, Terashita T (2012) Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. *Mycoscience* 53: 354–364.
- Silva JC, Fernandes OCC, Martins MS, Rodrigues Jr AC, Teixeira MFS (2010) Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 30: 48-54.
- Sumantha A, Larroche C, Pandey A (2006) Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology* 44: 211–220.
- Yadav SK, Bisht D, Tiwari S, Darmwal NS (2015) Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from

*Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*: 667-677.

Yin C, Zheng L, Chen L, Tan Q, Shang X, Ma A (2014) Cloning, expression, and characterization of a milk-clotting aspartic protease gene (Po-Asp) from *Pleurotus ostreatus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172: 2119–2131.

Zimmer KR, Borré GL, Trentin DS, Woicickoski Jr C, Frasson AP, Graeff AA, Gomes P, Macedo AJ (2009) Enzimas Microbinas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. *Revista Liberato* 10: 123-137.