

## Produção e extração de proteases por fermentação extrativa

Martim SR<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Silva TA<sup>1</sup>, Teixeira LS<sup>1</sup>, Cruz-Filho R F<sup>1</sup>, Fonseca TRB<sup>1</sup>, Marinho NMV<sup>1</sup>, Santos-Ebinuma, VC<sup>2</sup>, Teixeira MFS<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM, <sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista-UNESP E-mails: lelacarvalho21@yahoo.com.br, salomao.martim@gmail.com; tacionadeamorim@gmail.com; lorisasimas@gmail.com; rfilho@ufam.edu.br; tamis\_f@hotmail.com; nmvinhote@hotmail.com; mteixeira@ufam.edu.br

### Resumo

A etapa de extração é importante passo para introduzir bioprodutos no mercado. O método de fermentação extrativa é atrativo por integrar produção e extração em uma única etapa. O objetivo deste trabalho foi avaliar fermentação extrativa utilizando sistemas de duas fases aquosas (SDFA)-polietileno glicol (PEG)/sais de fosfato- para produzir e extrair proteases de diferentes micro-organismos (*Actinomiceto*, *Aspergillus pulverulentus*, *Fusarium solani* e *Serratia* sp). O cultivo submerso foi realizado em agitador rotativo em sistemas compostos por PEG 4000 g/mol e fosfato de potássio. Os parâmetros de purificação determinados foram: coeficiente de partição (K) e seletividade (Se). Dentre os resultados obtidos, as proteases produzidas por *Actinomiceto*, *A. pulverulentus* e *F. solani* particionaram para a fase rica em PEG (K>1) enquanto que as proteases de *Serratia* sp para a fase pobre em PEG (K<1). Em termos de Se, as proteases que migraram para a fase PEG apresentaram resultados satisfatórios, demonstrando que é possível produzir e extrair testes biocatalisadores por fermentação extrativa.

**Palavras-chaves:** protease, fermentação extrativa, micro-organismo, biotecnologia

## Introdução

O sistema de duas fases aquosas (SDFA) é amplamente utilizado para purificação de biomoléculas com aplicação nos mais diversos campos da biotecnologia, como por exemplo, enzimas, anticorpos e proteínas estruturais. Tais sistemas se separam em duas fases aquosas quando dois polímeros (por exemplo, PEG e dextrana) ou um polímero e um sal apropriado (por exemplo: fosfato ou citrato) são misturados e determinadas condições termodinâmicas sejam estabelecidas. A alta concentração de água (entre 70-90%) em tais sistemas favorece a estabilidade de moléculas biologicamente ativas durante a separação quando comparado com sistemas de duas fases em solvente orgânicos (Hatti-Kaul, 2000; Johansson, 1998). Uma aplicação alternativa destes sistemas aquosos é o processo da fermentação extrativa, o qual integra o processo de fermentação e o de extração visando aumentar a produtividade e diminuir os custos do processo (Viana-Marques et al., 2011). O conceito desta técnica é um processo de purificação que envolve a integração de uma etapa de extração como primeiro estágio de processo de extração para simultaneamente sintetizar e remover o bioproduto de interesse (Show et al., 2012). Além disso, neste sistema de extração as células são consideradas imobilizadas em uma das fases enquanto que o produto-alvo é particionado para a outra fase do sistema (Baniket al., 2003). Nos últimos anos, o interesse pela aplicação da fermentação extrativa tem aumentado e diversas biomoléculas têm sido extraídas por essa tecnologia, tais como: ácido clavulânico (Viana-Marques et. al., 2011), lipase (Ooiet al., 2011; Show et al., 2012), fosfatase (Pandey e Banik, 2011),  $\beta$ -caroteno e luteína (Chavez-Santoscoy et al., 2010) e elastase (Ying et al., 2005). Neste contexto, este trabalho visa estudar a extração de proteases produzidas por diferentes micro-organismos pelo método de fermentação extrativa em um sistema polimérico de duas fases aquosas (SPDFA) composto por PEG/sal fosfato.

## Material e Métodos

Os micro-organismos testados foram Actinomiceto, *Aspergillus pulverulentus*, *Fusarium solani*, os quais foram cedidos pela Coleção de Cultura do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA) e *Serratia* sp, oriundo do

Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Amazonas. Os meios empregados para o cultivo dos micro-organismos foram: extrato MGYB, para fungos; caldo Muller Hinton, para bactérias, e; meio MPE, para actinomiceto. Para a fermentação extrativa foram preparados sistemas de duas fases aquosas de Polietileno Glicol 4000 g/mol - Sais de fosfato de potássio (PEG-Sal) com uma massa total de 20 gramas, por pesagem das quantidades apropriadas de soluções concentradas de PEG (50% p/p) e sais de fosfatos (40% p/p) e meio de cultivo em frascos Erlenmeyer de 125 mL. O meio foi esterilizado a 121°C por 15 minutos. O cultivo submerso foi realizado em agitador rotativo a 150 rpm, 30° C e 72 horas. O caldo proveniente da fermentação extrativa foi centrifugado a 5.500xg por 20 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sistema de duas fases foi visualizado e as fases inferior e superior cuidadosamente coletadas com auxílio de seringa sem perturbar a interface. A dosagem de proteína do sobrenadante foi realizada através do método de Bradford (1976) modificado enquanto que a atividade da protease foi determinada de acordo com método descrito por Leighton *et al.* (1973). Os parâmetros de purificação determinados foram: coeficiente de partição (K = atividade da enzima na fase polimérica/atividade da enzima na fase salina) e seletividade (Se = coeficiente de partição da enzima alvo/coeficiente de partição de proteínas totais).

## Resultados e Discussão

Em todas as condições experimentais avaliadas houve separação de fases e todos os micro-organismos utilizados nessa pesquisa foram capazes de produzir proteases no sistema de fermentação extrativa com duas fases aquosas. Para os micro-organismos *F. solani* e *A. pulverulentos* obteve-se um coeficiente de partição de  $1,91 \pm 0,00$  e  $2,01 \pm 0,52$ , respectivamente. Para o actinomiceto foi obtido um coeficiente de partição de  $1,38 \pm 0,43$ . Este resultado indica que as proteases destes micro-organismos migraram preferencialmente para a fase top do sistema, rica em PEG. Por outro lado, as proteases produzidas por *Serratia* sp migraram preferencialmente para a fase bottom do sistema, pobre em PEG, com  $K = 0,51 \pm 0,03$ . Considerando o coeficiente de partição das proteínas, para todos os micro-organismos estas apresentaram K inferior a 1, sendo seus valores de  $0,57 \pm 0,18$ ,  $0,65 \pm 0,03$ ,  $0,41 \pm 0,11$  e  $0,28 \pm 0,04$  para *F. solani*, *A. pulverulentos*, Actinomiceto e *Serratia* sp, respectivamente. Estes resultados

demonstram que de maneira geral, as proteínas presentes no meio fermentado de todos os micro-organismos avaliados apresentam maior afinidade pela fase rica em sal do sistema. Em relação a seletividade, a qual é dependente dos valores de coeficiente de partição das proteases e proteínas totais, o Actinomiceto apresentou melhor resultado de Se ( $3,78 \pm 0,39$ ), sendo este 2 vezes superior ao obtido para proteases de *Serratia* SP ( $1,81 \pm 0,21$ ). Os resultados de Se para *F. solani* e *A. pulverulentos* foram  $3,41 \pm 1,19$  e  $3,09 \pm 0,71$ , respectivamente.

A produção de proteases por todos os micro-organismos no sistema de fermentação extrativa era esperado devido ao alto conteúdo de água e a baixa tensão interfacial as quais constituem ambiente biocompatível para a célula. As proteases produzidas por Actinomiceto, *F. solani* e *A. pulverulentos* migraram preferencialmente para a fase superior rica em PEG, possivelmente pela forte interação das regiões apolares da proteína com o polímero. Todavia, as proteases produzidas por *Serratia* sp migraram preferencialmente para a fase pobre em PEG. e o resultado de Se foi inferior a das outras cepas. Os altos resultados de Se para as proteases de Actinomiceto, *F. solani* e *A. pulverulentos* eram esperados uma vez que foi obtido valores de K superiores a 1 para as proteases e inferiores a 1 para as proteínas. A presença de contaminantes e as interações de cargas, hidrofóbicas, entre pontes de hidrogênio e forças de Vander Walls são fatores que podem interferir na eficiência da partição e na Se (Cavalcanti et al., 2006). Assim, os resultados de Se para as proteases obtidas por Actinomiceto, *F. solani* e *A. pulverulentos* foi satisfatório e mostrou que a técnica de extração empregada conseguiu separar as enzimas alvo de proteínas provenientes do meio fermentado destes micro-organismos. A *Serratia* sp é uma bactéria gram-negativa enquanto que actinomiceto é uma bactéria filamentosa e os demais micro-organismos são fungos filamentosos (Tortora et al., 2005). Desta maneira e considerando os resultados obtidos, as proteases obtidas possuem estruturas químicas diversas e pertencem a diferentes classes, sendo que as produzidas por *Serratia* sp apresentam baixa afinidade pelo PEG. De acordo com o exposto, o sistema de fermentação extrativa utilizando duas fases aquosas (PEG-Fosfato) pode ser utilizado para produção e separação de proteases dos micro-organismos testados. Porém, o tipo de protease e a sua afinidade por uma das fases do sistema é dependente da cepa empregada.

## Conclusão

O sistema de fermentação extrativa utilizando duas fases aquosas (PEG-Fosfato) pode ser utilizado como sistema integrado de produção e extração de proteases dos microorganismos testados. Entretanto, o tipo de protease e a sua afinidade por uma das fases do sistema é dependente da cepa empregada.

### **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e a Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior) pelo suporte financeiro.

### **Referências**

Chavez-Santoscoy A, Benavides J, Vermaas W, Rito-Palomares M (2010) Application of aqueous two-phase systems for the potential extractive fermentation of cyanobacterial products. *Chem Eng Technol*.33:177-182.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*72:248-254.

Cavalcanti MTH, Porto TS, Barros Neto B, Lima-Filho JL, Porto ALF, Pessoa Jr A (2006) Aqueous two-phase systems extraction of  $\alpha$ -toxin from *Clostridium perfringens* type A. *J Chromatogr B* 833:135-140.

Hatti-Kaul R (2000) Aqueous two-phase systems: methods and protocols: methods and protocols. Humana Press, Totowa, NJ.

Johansson, G (1998) Affinity partitioning of proteins using aqueous two-phase systems. In: JANSON, J.-C.; RYDÉN, L., eds. Protein purification: principles, high-resolution methods, and applications. 2.ed. New York: Jan-Christer Janson & Lars Rydén, Wiley-VCH, 1998

Leighton TJ, Doi RH, Warren RAJ, Kelln RA (1973) The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 76:103-122.

Ooi CW, Hii SL, Kamal SMM, Ariff A, Ling TC (2011) Extractive fermentation using aqueous two-phase systems for integrated production and purification of extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*. *Process Biochem* 46:68-73.

Pandey SK, Banik RM (2011) Extractive fermentation for enhanced production of alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 using aqueous two-phase systems. *Bioresour Technol* 102:4226-4231.

Show PL, Tan CP, ShamsulAnuar M, Ariff A, Yusof YA, Chen SK, Ling TC (2012) Extractive fermentation for improved production and recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* using a thermoseparating polymer in aqueous two-phase systems. *BioresourTechnol* 116:226-233.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2005) Microbiologia. Artmed, Porto Alegre, RS.

Viana Marques DA, Pessoa Jr A, Lima-Filho JL, Converti A, Perego P, Porto AL (2011) Extractive fermentation of clavulanic acid by *Streptomyces* DAUFPE 3060 using aqueous two-phase system. *Biotechnol Prog* 27:95-103.

Ying X, Guo-Qing H, Jing-Jun L (2005) Effective extraction of elastase from *Bacillus* sp. fermentation broth using aqueous two-phase system. *J Zhejiang Univ Sci B* 6:1087-1094.