



Análise Quantitativa da Produção de Proteases por *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp da Coleção de Fungos da Amazônia – CFAM/FIOCRUZ- AM em Diferentes Condições de Cultivo.

Thayana C. de Souza¹, Cláudia P. M. de Araújo^{1,2}, Josy C. Rodrigues¹, Raimundo Felipe C. Filho³ e Ormezinda C. C. Fernandes¹

Submetido 20/05/2015 – Aceito 16/07/2015 – Publicado on-line 25/08/2015

Resumo

Proteases são enzimas que hidrolisam proteínas em peptídeos e aminoácidos. Existe um interesse crescente por tais enzimas por parte da bioindustrial. Assim o presente estudo teve como objetivo determinar a atividade de proteases de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* em diferentes meios de cultura variando o tipo de fermentação. Para tanto foi realizada fermentação submersa nos modos estacionário e agitação com três meios de cultivo Agar Extrato de Malte, Agar Saboraand e Agar Czapeck. Ao final do experimento foi determinada a atividade proteolítica de cada extrato bruto e posteriormente selecionou-se o melhor meio para verificação da curva de produção de proteases em todas as espécies. A melhor condição de cultivo para produção de proteases para *Aspergillus* e *Penicillium* foi em Agar Extrato de Malte sob fermentação submersa em agitação. As espécies de *Penicillium* demonstraram ser produtoras de proteases, e a maioria das espécies de *Aspergillus* atingiram sua produção máxima nas primeiras 24 horas de fermentação.

Palavras-Chave: *Aspergillus*, *Penicillium*, protease, condições de cultivo

Abstract

Proteases are enzymes, which hydrolyse proteins into peptides and aminoacids. There is growing interest by such enzymes from bioindustrial. The present study aimed to determine the proteolytic activity of species of *Aspergillus* and *Penicillium* in different culture media by varying the type of fermentation. Therefore, submerged fermentation was carried out in stationary modes and bustle with three culture media: Agar Malt Extract, Agar Saboraand and Agar Czapeck. At the end of the experiment it was determined the proteolytic activity of each crude extract and subsequently was selected the best way to verify the protease production curve in all species. The best growing conditions for the production of proteases for *Aspergillus* and *Penicillium* was in Malt Extract Agar in submerged fermentation in agitation. The *Penicillium* species shown to be producing protease and most species of *Aspergillus* reached their peak production in the first 24 hours of fermentation.

Key-words: *Aspergillus*, *Penicillium*, protease, culture conditions

¹ Instituto Leônidas e Maria Deane- ILMD/Fiocruz/Amazonas, Rua Teresina, 476 - Adrianópolis, Manaus - AM, 69057-070. Correspondência E-mail thayanacruz@gmail.com

² Graduanda em Biomedicina Faculdade Estácio do Amazonas, Av. Constantino Nery, 60050-001, Manaus, AM

³ Instituto de Ciências Biológicas, s, UFAM, Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Japiim, 69077-000, Manaus, Amazonas,

1. Introdução

As proteases catalisam reações hidrolíticas, nas quais degradam proteínas em peptídeos e aminoácidos. Existe um crescente interesse por tais enzimas devido à possibilidade de aplicação industrial das mesmas (ZANPHORLIN et al., 2007; INÁCIO et al., 2013). É estimado que, a demanda global de enzima em 2013 era de 4,4 bilhões de dólares, e acredita-se que ocorrerá um aumento para 7,6 bilhões em 2020, as proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais, movimentando cerca de 1,2 bilhões de dólares, uma vez que desempenham importante papel na área da biotecnologia (TARI et al., 2006; GRAND VIEW RESEARCH, 2014).

Proteases são as mais importantes de enzimas industriais com diversas aplicações comerciais. A ação hidrolítica específica das proteases possui grande aplicação em diferentes setores, tais como a indústria de alimentos, couro, detergente, farmacêutica, seda, recuperação de prata a partir de filmes de raios-X, digestão de resíduos e estudo estrutural de proteínas (ABIDI et al., 2011; SAVITHA et al., 2011; INÁCIO et al., 2013)

Embora enzimas proteolíticas possam ser obtidas a partir de animais e plantas, os micro-organismo são a fonte preferida de aplicações industriais de enzimas devido à vantagem técnica e econômica (LAXMAN et al., 2005; GURUNG et al., 2013), entre estes, os fungos são produtores eficientes, predominando espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (SANDHYA et al., 2005; SILVA et al., 2011; FRISVAD, 2015).

Estas enzimas são produzidas por fermentação submersa, utilizando meio líquido com nutrientes solúveis, processo que tem sido considerado vantajoso devido à relativa facilidade para produção e recuperação de enzimas extracelulares, além de assegurar homogeneidade e controle dos parâmetros físico-químicos do meio (GERMANO et al., 2003; MIENDA et al., 2011; KNOB et al., 2014).

O presente estudo teve como finalidade de fazer uma análise quantitativa da produção de proteases em diferentes meios de cultura, variando o processo de fermentação de 10 espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* respectivamente depositados na Coleção de Fungos da Amazônia-CFAM/FIOCRUZ- AM.

2. Material e Método

2.1. Micro-organismos e condições de subcultivo

Os micro-organismo utilizados neste estudo foram obtidos da Coleção de Fungos da Amazônia-CFAM/FIOCRUZ. Foi selecionado 20 espécies de fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Aspergillus* (10) e *Penicillium* (10).

Para obtenção do inóculo, as espécies foram subcultivadas em Agar Extrato de Malte (MEA) em placas de Petri (100 mm x 15 mm), a 28 °C por 7 dias, observando as características macromorfológicas em intervalos de 24 horas.

2.2. Investigação qualitativa da atividade proteolítica

Para verificação da produção de proteases, foi utilizado cultura estoque de 20 espécies obtidas anteriormente (item 2.1). Um fragmento de cada cultura foi repicado no centro da placa de Petri contendo meio Agar Leite (TEIXEIRA et al., 2011) suplementado com gelatina a 5%. As placas foram incubadas em estufa BOD a 28 °C por 72 horas. A produção de proteases foi determinada qualitativamente pela formação de halos translúcidos ao redor das colônias.

2.3. Atividade proteolítica em diferentes meios de cultura e condições de fermentação

Para avaliar a melhor condição de fermentação associado ao meio de cultura para produção de proteases, selecionou-se três meios de cultura [Extrato de Malte (MEA), Saboraand (SAB) e Czapeck (CZ)] e duas formas de fermentação submersa (agitação orbital e estacionária). Foram realizados cultivos em frascos de Erlenmeyers de 50 mL contendo 30 mL de meios de fermentação líquida. Da cultura estoque foram transferidos para cada frasco 1 mL da suspensão de esporos na concentração 5×10^6 esporos/mL dos respectivos isolados. A fermentação submersa sob agitação foi conduzida em agitador orbital com 150 rpm a 30 °C durante 96h, a fermentação submersa estacionária foi conduzida nas mesmas condições da anterior sem a agitação. A biomassa foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo. No extrato bruto recuperado foi determinada a atividade proteolítica (SILVA NEVES et al., 2006).

2.4. Avaliação da produção de proteases na melhor condição de cultivo

A análise da produção de proteases foi realizada com base no resultado do meio com melhor eficiência na produção de proteases obtidos no item 2.3. Os cultivos foram preparados em frascos de Erlenmeyers de 50 ml contendo 30 ml de meio líquido obtidos no item 2.3. Da cultura estoque foram transferidos para cada frasco 1 ml da suspensão de esporos na concentração 5×10^6 esporos/mL dos isolados. A fermentação submersa foi conduzida a 150 rpm por 30 °C durante 120 horas. Para determinação de uma curva de produção de proteases, uma alíquota foi retirada em intervalos de 24 horas. A biomassa foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo utilizando papel de filtro Whatman nº1 e posteriormente em membrana (0,45 µm). No extrato bruto recuperado foi determinada a atividade proteolítica.

2.5. Determinação quantitativa da atividade proteolítica

Os extratos brutos foram submetidos à avaliação proteolítica quantitativa utilizando caseína como substrato, em tampão fosfato 0,15 M, conforme descrito por Fleuri e Sato (2008). O volume de 0,5 ml dos extratos foi adicionado em 1,5 mL de caseína (2,0 %) e 1,0 mL de tampão fosfato 0,15 M, pH 7,5. Posteriormente, a solução enzimática foi incubada a 28 °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. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzimas capazes de produzir um aumento na absorbância de 0,01 em 1 hora a 280 nm, sendo expressa em U/mL, segundo Kirsch et al. (2011). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.6. Análise estatística da atividade proteolítica

Para identificar diferenças significativas entre as variáveis foi realizada análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey a 5% de significância utilizando o software MINITAB 16.2.1 (2010).

3. Resultados e Discussão

Os resultados da atividade de proteases em diferentes meios de cultura e condições de fermentação, comprovaram haver diferença

significativa ($p < 0,05$) na produção de proteases entre as 20 espécies estudadas.

Ambos os gêneros analisados apresentaram maior produção em fermentação submersa sob agitação no meio MEA, que demonstrou ser a melhor fonte de nutrientes em relação ao quantitativo de atividade de proteases e os demais meios analisados

As amostras *Aspergillus flavus* CFAM 29 e *Penicillium* sp CFAM 572, foram as maiores produtoras de proteases: 936,89 U/ml e 469,78 U/ml, respectivamente (Tabela 1). Essa diferença na atividade de proteases pode ser atribuída ao fato do uso de diferentes fontes de carbono nos meios (CZ: sacarose; SAB e MEA: glicose). Poza et al. (2001) e Ire et al. (2014) testaram diferentes açúcares e concentrações para a produção de proteases por *Candida caseinolytica* e *Aspergillus carbonarius* respectivamente e obtiveram resultados variados conforme a fonte e concentração utilizada.

Baixas concentrações de fontes de carbono permitem crescimento e síntese de enzimas em valores máximos, porém, altos valores de açúcares resultaram em repressão catabólica na atividade da enzima (IRE et al., 2011).

SAB e MEA possuem peptona como fonte de nitrogênio em suas composições, enquanto que o CZ não é suplementado com nenhuma fonte de nitrogênio.

Segundo Papagianni (2004), a omissão de fonte de nitrogênio no meio afeta bastante o crescimento de fungos e produção de metabólitos, Ire et al. (2011) estudando a produção de protease por *Aspergillus carbonarius* utilizando fermentação submersa verificou melhor produção de protease em baixas concentrações da fonte de nitrogênio, corroborando com este trabalho, pois os meios suplementados com fonte de nitrogênio (SAB e MEA) foram os que apresentaram maiores atividades proteolíticas.

Malathi e Chakraborty (1991) e Sharma e De (2011) adicionaram extrato de levedura como fonte de nitrogênio na produção de protease alcalina por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus tamarii*, e observaram uma influência positiva na produção de protease alcalina por esses microorganismos respectivamente.

Estudos realizados por Merheb et al. (2007) e Fernandes et al. (2012) comprovaram que a produção de proteases por culturas fúngicas apresentam variações no quantitativo de enzima

produzida em função do meio de cultura utilizado, ou seja, os micro-organismos apresentam fisiologia diferenciada em diferentes condições de cultivo e de meios utilizados.

Segundo Rodarte et al. (2011) os nutrientes, bem como o quantitativo destes, interferem na produção e na bioquímica das proteases. Ogrydziak (1993) afirma que a atividade de proteases é altamente dependente das

condições experimentais e da metodologia empregada, resultados que concordam com os apresentados nesta pesquisa, onde MEA e SAB apresentaram os maiores valores de atividade proteolítica, seguidos pelos baixos valores encontrados em CZ.

Tabela 1: Produção de protease em diferentes meios de cultura em fermentação submersa estacionária e sob agitação

Espécie	Fermentação Estacionário			Fermentação Sub Agitação		
	CZ	SAB	MEA	CZ	SAB	MEA
<i>Penicillium sp.</i> CFAM 91	0,00	216,44	115,11	87,11	304,89	411,78
<i>Penicillium fellutanum</i> CFAM 60	0,00	141,56	209,33	75,56	329,33	447,33
<i>Penicillium citrinum</i> CFAM 233	148,67	246,22	256,44	0,00	158,67	378,89
<i>Aspergillus sp.</i> CFAM 694	38,89	263,78	228,00	96,89	229,56	318,22
<i>Aspergillus niger</i> CFAM 328	0,00	161,11	86,67	435,11	268,44	339,33
<i>Penicillium sp.</i> CFAM 572	0,00	74,89	168,67	0,00	106,44	469,78
<i>Penicillium sp.</i> CFAM 140	1,33	108,44	79,78	48,22	347,11	349,11
<i>Aspergillus japonicus</i> CFAM 626	0,00	0,00	131,11	60,22	253,78	448,22
<i>Aspergillus flavus.</i> CFAM 29	50,44	159,33	196,67	202,00	551,78	936,89
<i>Aspergillus flavus</i> CFAM 28	61,11	168,89	181,78	4,44	497,33	804,00
<i>Penicillium implicatum</i> CFAM 521	8,00	75,78	208,00	107,56	280,00	453,33
<i>Penicillium fellutanum</i> CFAM 504	36,22	130,67	115,56	61,56	56,44	17,11
<i>Aspergillus flavo-furcatis</i> CFAM 88	128,00	74,44	151,33	135,78	713,78	880,67
<i>Penicillium sp.</i> CFAM 496	44,67	129,11	145,78	0,71	78,00	175,56
<i>Penicillium sp.</i> CFAM 473	90,22	124,67	220,89	18,00	122,00	80,44
<i>Aspergillus flavus</i> CFAM 403	102,44	107,11	175,56	252,22	491,11	768,00
<i>Penicillium sp.</i> CFAM 393	162,22	242,44	116,00	26,00	228,22	88,67
<i>Aspergillus oryzae</i> CFAM 540	34,22	187,11	143,78	135,56	84,00	64,67
<i>Aspergillus niger</i> CFAM 230	46,89	82,44	164,89	0,00	86,89	207,11
<i>Aspergillus niger</i> CFAM 501	152,89	167,56	175,33	60,44	8,67	110,00

Extrato de Malte (MEA); Saboraand (SAB) e Czapeck (CZ). Umidade de atividade de protease (U/ml)

A verificação do tempo de produção de proteases para o gênero *Aspergillus* e *Penicillium* foi verificada via fermentação submersa sob agitação em meio líquido MEA, uma vez que estes apresentaram maior produção de enzimas nessas condições.

Na Figura 1, pode ser observado que as espécies do gênero *Penicillium* produziram proteases a partir das primeiras 24 horas. *P. fellutanum* CFAM 60, *Penicillium sp* CFAM 91, e *Penicillium implicatum* CFAM 521, atingiram seus maiores valores nesse período, correspondendo a 247 U/ml, 288 U/ml, e 211 U/ml, respectivamente. Por outro lado, *P. citrinum*

CFAM 233 (375 U/ml), *Penicillium sp* CFAM 572 (360 U/ml) e *Penicillium sp* CFAM 393 (423 U/ml) atingiram maior produção no último dia de fermentação. *P. fellutanum* CFAM 504 diferente dos anteriores produziu maior atividade proteolítica (581 U/ml), no terceiro dia de fermentação.

A produção de proteases do gênero *Aspergillus* pode ser observado na Figura 2, que apresenta 70% das espécies produzindo seus maiores valores de atividade de proteases nas primeiras 24 horas de fermentação, e declínio ao longo do tempo. Apenas *A. oryzae* CFAM 540 atingiu o pico de produção em 120 horas de

fermentação (324 U/ml). O valor máximo de atividade de proeotase foi observado em *A. niger* CFAM 501 (334 U/ml).

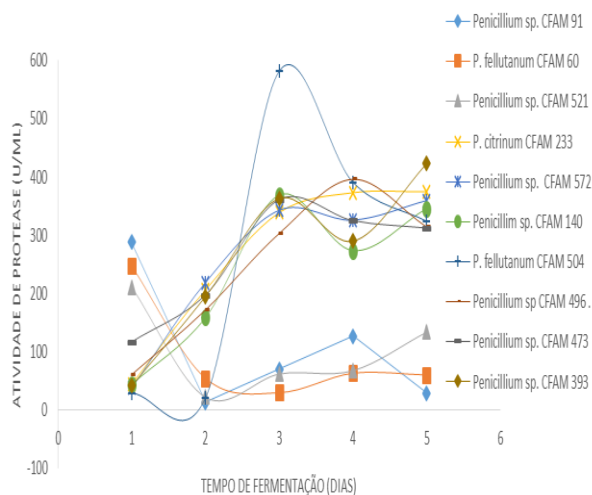


Figura 1. Atividade proteolítica de *Penicillium spp* por fermentação submersa.

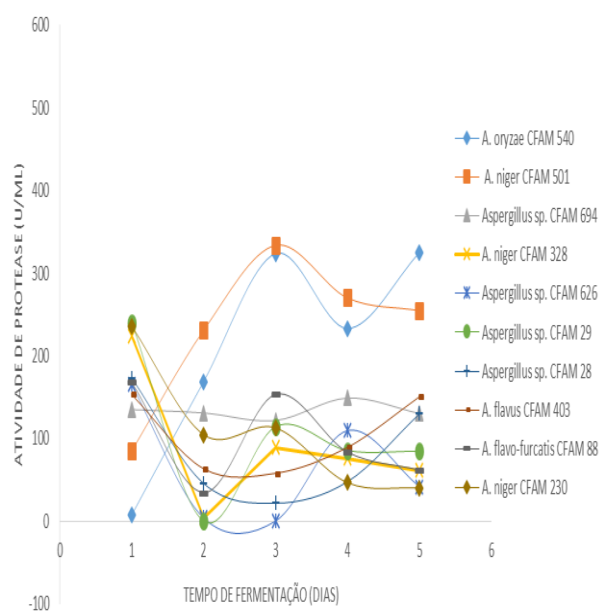


Figura 2. Atividade proteolítica de *Aspergillus spp* por fermentação submersa.

4. Conclusão

Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* apresentaram maior produção de proteases via fermentação submersa sob agitação em meio MEA. As espécies de *Penicillium* apresentaram maior produção de proteases quando comparado com o gênero *Aspergillus*. As espécies em estudo

apresentaram exigências nutricionais para produção de proteases, características relevantes para aplicação biotecnológica.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas-FAPEAM. Ministério da Saúde e CNPq

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

- ABIDI, F. et al., Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. **Process Biochem**, v. 46, p. 2301-2310, 2011.
- FERNANDES, E. G.; VALERIO, H. M.; FELTRIN, T.; SAND, S. T. V. D. Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates. **Braz. J. Microbiol.** v.43, n.2, p. 827-833. 2012.
- FLEURI, L.F., SATO, H.H. 2008. Study of different parameters in the production of Lytic enzymes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 2008, n. 28, p. 299-310.
- FRISVAD, J. C. Taxonomia, quimiodiversidade, e quimioconsistência de *Aspergillus*, *Penicillium*, e *Talaromyces* espécies. **Frontiers in Microbiology**. v. 5, p. 1-7, 2015.

GERMANO, S., PANDEY, A., OSAKU, C.A., ROCHA, S.N., SOCCOL, C.R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state of fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, 2003, n. 32, n. 2, p. 246-251.

GRAND VIEW RESEARCH, I. Global Enzymes Market By Product (Carbohydrase, Proteases, Lipases, Polymerases e Nucleases) Expected to Reach USD 7,652.0 Million by 2020 2014.

GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V. A Broader View: Microbial Enzymes and Their



Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. **BioMed Research International**. DOI: 10.1155/2013/329121, p. 1-18, 2013.

Inácio, f. d.; Bueno, p.; Nichida, s. Vernier, k. Silva, c. a.; Peralta, r. m.; Souza, c. g. m. Produção de Protease e Lacase por Basidiomicetos. **Biochemistry and Biotechnology Reports**. Número Especial v. 2, n. 3, p. 359-362, 2013.

IRE, F. S.; OKOLO, B. N.; MONEKE, A. N.; ODIBO, F. C. Influence of cultivation conditions on the production of a protease from *Aspergillus carbonarius* using submerged fermentation. **African Journal of Food Science**. v. 5, n. 6, p. 353-365, 2011.

KIRSCH, L.S., PINTO, A.C.S., PORTO, T.S., PORTO, A.L.F., TEIXEIRA, M.F.S. The influence of different submerged cultivation conditions on mycelial biomass and protease production by *Lentinus citrinus* Walley et Rammeloo DPUA 1535 (Agaricomycetidae). **Internl Jour of Med Mushrooms**, 2011, v. 13, n. 2, p. 185-192.

KNOB, A.; FORTKAMP, D.; PROLO, T.; IZIDORO, S. C.; ALMEIDA, J. M. Agro-residues as Alternative for Xylanase Production by Filamentous Fungi. **BioResources**. v. 9, n. 3, p. 5738-5773, 2014.

LAXMAN, R.S., SONAWANE, A.P., MORE, S.V., RAO, B.S., RELE, M.V., JOGDAND, V.V. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. **Process Biochem**. 2005, v. 40, p. 3152-3158.

LONGO, M.A., NOVELLA, I.S., GARCIA, L. A., DIAZ, M. Comparison of *Bacillus subtilis* and *Serratia marcescens* as proteases producer under operating conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Oska, 1999, v. 88, n. 1, p. 35-40.

MALATHI, S., CHAKRABORTY, R. Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-state fermentation conditions for use as a depilation agent. **Applied Environmental Microbiology**, 1991, v. 57. p. 712-716.

MERHEB, C.W., CABRAL, H., GOMES, E., DA-SILVA, R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, 2007, v.104. p. 127-131.

MIENDA, B. S.; IDI, A.; UMAR, A. Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications - An overview. *Research in Biotechnology*, v. 2, n. 6, p. 21-26, 2011.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, 2004, v. 22, p. 189-259.

POZA, M.; MIGUEL, T.; SIERO, C.; VILLA, T. G. Characterization of a broad pH range protease of *Candida caseinolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, 2001, v. 91, n. 5, p. 916-921.

RODARTE, M. P.; DIAS, D. R.; VILELA, D. M.; SCHWAN, R. F. Atividades proteolíticas de bactérias, leveduras e fungos filamentosos isolados de frutas café (*Coffea arabica* L.). **Acta Sci., Agron**. [online]. v.33, n. 3, p. 457-464. 2011.

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*, 2005, v. 40, p. 2689-2694, <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.001>

SAVITHA, S. et al., Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **J Taiwan Inst Chem Eng**, v. 42, p. 298-304, 2011.

SHARMA, N.; DE, K. Production, purification and crystallization of an alkaline protease from *Aspergillus tamarii* [EF661565.1]. **Agric. Biol. J. N. Am**. v. 2, n. 7, p. 1135-1142, 2011.

SILVA NEVES, K. C.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazonica**. V. 36, n. 3, p. 299 - 306, 2006.

SILVA, L. R. C.; SOUZA, O. C.; FERNANDES, M. J. S.; MASSA, D. M. L.; COELHO, R. R. R.; MOTTA, C. M.S. Diversidade de fungos cultiváveis do camarão *Litopenaeus vannamei* Boone de fazendas de criação no Brasil. **Braz J Microbiol**. v. 42, n. 1, p. 49-56, 2011.

TARI, C., GENCKAL, H., TOKATLI, F. Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a



newly isolated *Bacillus* sp. L 21. **Process Biochem.**, 2006, v. 41, p. 659–665.

TEIXEIRA, M.F.S., SILVA, T.A., PALHETA, R. A., CARNEIRO, A.L.B., ATAYDE, H.M. Fungos da Amazônia: **Uma riqueza inexplorada (Aplicações biotecnológicas)**. Manaus. Edua. 1º Ed. 2011.

ZANPHORLINA, L.M., CABRALB, H., ARANTESB, E., ASSISC, D., JULIANOC, L. M., JULIANOC, A., DA-SILVAA, R., GOMESA, E. BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**, 2011, v. 46, p. 2137–2143.