ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE -
BNS21

EXTRAÇÃO DE PROTEASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus* UCP 1279 UTILIZANDO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS

M. F. SILVA¹, O. S. SILVA⁴, V. M. OLIVEIRA², J. C. SILVA³, F.T.B. ROCHA², S.R.S. SILVA², T. S. PORTO¹, M. N. CARNEIRO-DA-CUNHA²

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns

² Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal

³ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências

⁴ Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).

E-mail para contato: marcianieves@yahoo.com.br

RESUMO – *As proteases podem ser obtidas através de processos fermentativos: fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES). Apesar da produção de enzimas microbianas apresentarem inúmeras vantagens, em detrimento às outras fontes, faz-se necessário a purificação da mesma, tendo em vista que no processo fermentativo também há a produção de outros metabólitos. Diversos métodos são utilizados para purificação e pré-purificação dessas biomoléculas. O Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) destaca-se como um método de purificação, devido ao seu custo-benefício, a possibilidade de aumento de escala e a minimização da desnaturação das proteínas, mantendo-as ativas após o processo. O presente trabalho objetivou extrair proteases produzidas por *Aspergillus* UCP 1279 utilizando SDFA. Um planejamento experimental completo 2⁴ foi utilizado para avaliar a influência das variáveis concentração e massa molar do PEG, concentração de citrato e pH. Três variáveis-resposta foram obtidas (aumento de pureza, coeficiente de partição e recuperação da enzima). Os resultados atingidos foram: coeficiente de partição de 19,24, aumento de pureza de 3,63 com uma recuperação de 196% na fase superior do sistema rica em PEG. O ensaio que proporcionou as melhores condições de extração da enzima foi constituído por PEG de massa molar 8000 (g/mol) e concentração a 20% (m/m); concentração de citrato de 20% (m/m); e pH 8,0.*

ABSTRACT - *Proteases are obtained through fermentation processes: submerged fermentation (FS) and solid state fermentation (FES). The production of microbial enzymes has many advantages, in detriment to other sources, it is necessary your purifcation, considering that in the fermentation process there is also the production of other metabolites. SDFA purification method, stands out due to its cost-benefit, the possibility of expansion and minimization of protein denaturation, keeping them active after the process. The present work aimed to extract proteases produced by *Aspergillus* sp UCP 1279, using SDFA. A experimental design (2⁴) was used to evaluate an influence*

of the variable concentration and molar mass of PEG, citrate concentration and pH. Three response-variables were obtained (increase of purity, partition coefficient and recovery of the enzyme). The results obtained were: partition coefficient of 19.24, increase of purity of 3.63 with recovery of 196% in the top phase (PEG). The best enzyme extraction conditions was 8000 g/mol PEG molar mass, PEG concentration at 20% (m/m) and citrate concentration of 20% (m/m); in pH 8.0.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são um grande grupo de biocatalisadores que atuam em diversas reações químicas, sendo responsáveis por muitos processos realizados no metabolismo, sejam eles anabólicos ou catabólicos, dos quais resultam moléculas essenciais ao desenvolvimento e manutenção da vida de todos os organismos (HOLLYDAY; MITCHELL; THORNTON, 2009).

As proteases são enzimas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas. As mesmas, em geral, são classificadas em endopeptidases e exopeptidases, de modo que, a primeira atua clivando a parte interna da cadeia peptídica, enquanto a segunda cliva as extremidades da cadeia, próximo aos grupos terminais (N-terminal ou C-terminal) (RAO *et al.*, 1998). A hidrólise é fundamental para a determinação da composição em aminoácidos das proteínas (LEHNINGER, 2007).

Os organismos vivos são as fontes de obtenção das enzimas. As proteases obtidas de plantas possuem a desvantagem do tempo de extração, necessidade de terra para plantio e a susceptibilidade as condições climáticas. A extração de enzimas de origem animal acarreta no abate do mesmo e sua disponibilidade para tal fim. Neste contexto, destacam-se as enzimas de origem microbiana, as quais são preferidas por apresentarem alto grau de especificação, fácil manipulação genética e possibilitarem o aumento de escala; sendo dependentes, em geral, de condições de crescimento como, temperatura, pH, fonte de carbono e nitrogênio (RAO *et al.*, 1998; BAZARZHAPOV *et al.*, 2006).

Os micro-organismos representam uma fonte atraente de proteases uma vez que podem ser cultivados em grandes quantidades, em um período de tempo relativamente curto por meio estabelecido de métodos de fermentação, produzindo uma quantidade abundante e regular do produto desejado. Além disso, as proteínas microbianas podem ser armazenadas durante semanas sem perda significativa de atividade. Em geral, as proteases microbianas são de natureza extracelular e são diretamente segregadas para o caldo de fermentação, diminuindo as etapas para a purificação da enzima em comparação com as proteases obtidas a partir de plantas e animais (GUPTA *et al.*, 2002).

As proteases podem ser obtidas através de processos fermentativos: fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES). A FES é caracterizada pela ausência de água livre e por possibilitar o aproveitamento de resíduos ou subprodutos da indústria, enquanto que a FS é a técnica mais empregada nos países ocidentais, devido ao fácil controle das condições de crescimento, bem como, a possibilidade de homogeneização o que evita a formação de gradientes no processo (SILVA *et al.*, 2005).

Os principais gêneros empregados na produção de proteases microbianas são: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, devido os mesmos produzirem enzimas extracelulares, facilitando a extração, bem como, tais gêneros são considerados seguros, não sendo observada produção de toxinas (SANKEERTHANA *et al.*, 2013).

Apesar da produção de enzimas microbianas apresentarem inúmeras vantagens, em detrimento às outras fontes, faz-se necessário a purificação da mesma, tendo em vista

que no processo fermentativo também há a produção de outros metabólitos, entre os quais, pode haver contaminantes e inibidores.

Diversos métodos são utilizados para purificação e pré-purificação, com destaque para a Cromatografia e o Sistema de duas fases aquosas (SDFA), sendo que o SDFA é mais viável, devido ao custo-benefício, a possibilidade de aumento de escala e a minimização da desnaturação das proteínas, mantendo-as ativas após o processo.

O SDFA conceitua-se na formação de duas fases, mediante o uso de dois polímeros ou um polímero e um sal, para que aja a partição da enzima para uma fase, enquanto os contaminantes migrem para outra (PORTO, 2004). As macromoléculas podem ser separadas de acordo com as suas propriedades de superfície e características dos componentes do sistema. A separação pode ser baseada no tamanho, carga elétrica e características hidrofílicas (PADILHA, 2010; MAZZOLA ET AL. 2008; SANTANA, 2006; ASENJO, 1990).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Micro-organismo

Foi utilizado fungo filamentoso *Aspergillus* UCP 1279 oriundo da coleção de culturas UCP da Universidade Católica de Pernambuco.

Meios de esporulação e manutenção

O meio de cultura utilizado para a manutenção das linhagens de micro-organismos foi o BDA (Batata Dextrose Agar) em óleo mineral e repicados a cada 30 dias. A esterilização dos meios de cultura foi realizada em autoclave a 121°C, 1 atm de pressão, durante 20 minutos. As amostras foram incubadas a 30°C por sete dias.

Preparação do inóculo

A espécie selecionada como produtora de protease foi repicada em Erlenmeyers contendo meio de cultura Batata Dextrose Agar incubados a 30°C em estufa por 7 dias até ocorrer esporulação. Os esporos foram coletados com a adição de 10mL de solução de NaCl (0,9% p/v) e Tween 80 (0,01% v/v) previamente esterilizados. Após a coleta dos esporos foi realizada contagem microscópica em câmara de Neubauer. Uma quantidade suficiente para a concentração final de 10^5 esporos/mL foi inoculada nos Erlenmeyers.

Produção de proteases

O meio de cultura denominado MS-2 e descrito por PORTO *et al.*, (1996) foi utilizado para a produção das proteases de interesse por meio da fermentação submersa. A constituição do meio para 100mL de água destilada foi de: farinha de soja (6% p/v), NH_4Cl (0,1% p/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,06% p/v), glicose (0,5% p/v), K_2HPO_4 (0,435 %p/v) e 1 mL de solução mineral (100mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 100mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 100mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e água destilada q.s.p. 100mL).

Atividade proteásica

A atividade da protease foi determinada como descrito por Ginther (1979). Para essa determinação, adicionou-se 0,15 mL do extrato enzimático e 0,25 mL de azocaseína (1% (p/v) em tampão Tris HCl, 0,2 M pH 7,2 e colocou-se em câmara escura por uma hora à temperatura ambiente. A reação foi interrompida, após o tempo indicado, com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v) e em seguida a solução foi centrifugada a 12.000 rpm por 20 minutos e temperatura de 4 °C. Foi feita a leitura por espectrometria

com 0,8 mL do sobrenadante pipetado adicionado de 0,2 mL de NaOH 1,8 N, onde a absorbância foi medida à 420 nm contra um branco.

Purificação através do Sistema de Duas Fases Aquosas PEG-Citrato

Os parâmetros de extração estudados foram: massa molar e concentração do PEG, concentração do citrato de sódio e pH na extração da protease, utilizando um planejamento fatorial 2^4 . Os sistemas de suas fases aquosas foram preparados em tubos cônicos e graduados de 15 mL, a partir da mistura de PEG de diferentes massas molares (400, 3350 e 8000 g/mol) e diferentes concentrações (20, 22, 24 %), com o sal citrato de sódio em diferentes concentrações (15, 17,5 e 20%), acrescido de ácido cítrico para ajuste do pH em diferentes valores (6,0, 7,0, 8,0), a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Aos tubos contendo o sistema foi adicionado o extrato bruto enzimático, que corresponde a 20% (m/m) da massa total do sistema. A água foi adicionada para um valor final de 10 g. Após agitação por vórtex 1 min, as fases foram separadas por decantação por 60 min. Em seguida, os volumes das fases foram mensurados, alíquotas das fases foram retiradas separadamente com pipetas e analisadas para a concentração de proteína e atividade proteásica para posterior cálculo sobre as variáveis respostas: coeficiente de partição (K), aumento de pureza (AP), e recuperação (Y). Após a realização dos experimentos, a análise estatística dos resultados foi realizada, com o auxílio do programa Statistica 8.0 (STATSOFT INC, 2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na extração da protease produzida por *Aspergillus* mediante o Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) PEG/Citrato estão apresentados na Tabela 1. Os ensaios 1, 3, 9 e 11 não formaram fase. Segundo PADILHA et al., (2011) isso ocorre, pois, a concentração dos componentes nestes ensaios não foi suficiente para a formação das fases, de modo que estes pontos ficaram abaixo da curva binodal que rege o sistema.

O coeficiente de partição (K) estima quantitativamente a migração da biomolécula para determinada fase. Como pode ser observado na Tabela 1; a enzima apresentou afinidade na maioria dos ensaios pela fase rica em PEG ($K > 1$). No entanto, verificamos que na concentração de citrato 15 e 17,5% em pH 6,0 e 7,0 o coeficiente de partição apresentou $K < 1$, o que nos permite afirmar que a enzima possui afinidade pelas duas fases.

Observa-se que a massa molar do PEG influencia significativamente a partição, pois com menores valores de MMPEG a partição aumenta (Tabela 1). Este comportamento é justificado pela teoria do volume excluído, pois quanto maior a massa do polímero menor será o espaço ou volume livre na solução e é neste espaço para onde as moléculas particionam. Então em grandes massas molares, o volume excluído aumenta e conseqüentemente diminui a partição das biomoléculas para a fase rica em polímero.

Tabela 1. Resultado do planejamento fatorial completo 2^4 para a purificação de protease por *Aspergillus* SIS utilizando SDFA PEG/Citrato.

Ensaio	MM _{PEG} (g/mol)	C _{PEG} (%)	C _{CIT} (%)	pH	K	Y _{PEG} (%)	FP _{PEG}
1	400	20	15	6	***	***	***
2	8000	20	15	6	0,24	12,37	0,26
3	400	24	15	6	***	***	***
4	8000	24	15	6	0,63	23,90	0,36
5	400	20	20	6	3,70	75,74	0,85
6	8000	20	20	6	22,23	132,46	1,38
7	400	24	20	6	13,15	109,32	0,90
8	8000	24	20	6	1,66	57,72	0,58
9	400	20	15	8	***	***	***
10	8000	20	15	8	1,23	65,54	0,84
11	400	24	15	8	***	***	***
12	8000	24	15	8	1,97	123,35	1,26
13	400	20	20	8	4,12	155,68	2,01
14	8000	20	20	8	19,24	195,96	3,63
15	400	24	20	8	3,07	184,47	1,88
16	8000	24	20	8	3,43	188,97	1,67
17	3350	22	17,5	7	0,54	42,77	1,24
18	3350	22	17,5	7	0,93	56,01	1,73
19	3350	22	17,5	7	0,36	29,19	0,94
20	3350	22	17,5	7	0,93	41,31	1,29

K-coeficiente de partição; Y- recuperação; FP- fator de purificação; M- massa molar; C- concentração; *- não formou fase.**

Os ensaios 6 e 14 (Tabela 1), apresentaram um maior direcionamento da enzima para fase rica em PEG. Isso ocorre, quando a solubilidade das biomoléculas na fase inferior, rica em sal, diminui com o aumento da concentração de sal, o que resulta em um aumento da partição das biomoléculas para fase superior, a este efeito dá-se o nome de “Salting out”.

Em altas concentrações de sais a solubilidade das proteínas diminui, de modo a influenciar sua partição para a fase oposta. Resultados qualitativamente semelhantes foram relatados para a recuperação da protease de *Clostridium Perfringens* com PEG-citrato SDFA, em que um aumento na C_{cit} de 15% para 20%(m/m) levou a um aumento de K de 0,62 para 29,25 (Porto et al., 2007).

Uma das grandes vantagens que o SDFA apresenta é a possibilidade de altos

índices de recuperação (CAVALCANTI et al., 2006). Na maioria dos ensaios do SDFA, obteve-se altos valores de recuperação (Y), onde a concentração de citrato (20%) apresentou recuperações maiores que 100% (Tabela 1). Isto se faz possível devido à eliminação de contaminantes.

Os resultados obtidos para a variável resposta recuperação enzimática (Y) obtida na fase rica em PEG, estão apresentados na figura 2. Foi observado que a concentração de citrato (Ccit) e o pH foram os principais efeitos significativos, com influência positiva, desse modo, o aumento de ambos favorecem a recuperação da protease presente no líquido fermentado.

A concentração de citrato à 20% (m/m) e pH 8,0 foram as melhores condições para a extração da protease na fase PEG. Similarmente, a concentração de citrato também influenciou positivamente o coeficiente de partição para fase rica em PEG, $K > 1$.

O sal com alta concentração repele as proteínas, e a enzima de interesse, pelo efeito denominado “salting out”, implicando no aumento da recuperação na fase PEG. No pH 8,0 muitas enzimas são desnaturadas, aumentando a hidrofobicidade das mesmas, de modo que estas tendem a se ligarem ao PEG em busca de estabilização. Como foi observado por Silva et al., 2016 para a protease extraída por SDFA/Citrato de sódio de *Aspergillus tamaraii*, onde demonstrou uma maior recuperação em alta concentração de citrato 20% (m/m) e pH 8, obtendo altos valores de recuperação chegando a 106,1%.

Figura 2. Gráfico de Pareto para a estimativa dos efeitos sobre a Recuperação (Y) da protease obtida de *Aspergillus* UCP 1279.

O SDFA PEG/Citrato que apresentou o maior fator de purificação foi o ensaio 16, com composição de MMPEG 8000 (g/mol), Ccit 20% (m/m), CPEG 24% (m/m) e pH 8. Nessas condições, foi obtido um Y de 195.96% com K de 19,24 e FP de 3,63.

O aumento da concentração de citrato desencadeia o fenômeno de “salting out” empurrando a maioria das proteínas para a fase PEG, onde a proteína de interesse é dissociada dos contaminantes. A Ccit teve uma forte influencia positiva sobre a protease, aumentando o valor de FP de 0,26 para 3,63, quando a Ccit aumentou de 15% para 20%.

Silva et al., (2016) apresentaram um efeito semelhante para protease obtida de *A. tamaraii* URM4634, observando que com o aumento da Ccit de 15% para 20% o FP aumentou de 2,89 para 3,95.

4. CONCLUSÃO

Apurificação da protease produzida por *Aspergillus* UCP 1279 em Sistema de Duas Fases Aquosas, demonstrou que esta biomolécula apresentou maior afinidade com a fase rica em PEG ($K > 1$), foram obtidos altos valores de recuperação (Y), onde a concentração de citrato (20%) apresentou recuperações maiores que 100% chegando a alcançar o valor máximo de 195,96%. Os melhores resultados para o fator de purificação da protease foram obtidos com o sistema de duas fases aquosas constituído por: PEG de massa molar 8000 (g/mol) e concentração a 20% (m/m); concentração de citrato de 20% (m/m); e pH 8,0. O coeficiente de partição foi de 19,24, aumento de pureza de 3,63 e a recuperação da atividade enzimática de 196% na fase superior do sistema. Os resultados atingidos demonstram que o SDFA foi capaz de recuperar e purificar eficazmente a enzima alvo.

5. REFERÊNCIAS

BAZARZHAPOV, B. B.; LAVRENT'EVA, E. V.; DUNAEVSKII, Ya. E.; BILANENKO, E.N.; NAMSARAEV, B. B. Extracellular proteolytic enzymes of microscopic fungi from thermal springs of the Barguzin valley (northern baikal region). *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 42; nº 2; p.186-189, 2006.

CAVALCANTI, M.T.H.; PORTO, T.S.; NETO, B.B.; LIMA-FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F.; PESSOA Jr. A., 2006. Aqueous two-phase systems extraction of α - toxin from *Clostridium perfringens* type A. *Journal of Chromatography B.*, 833: 135-140.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; KHAN, S.; CHAUHAN, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60:381–395, 2002.

HOLLIDAY, G. L.; MITCHELL, J. B.; THORNTON, J. M. Understanding the functional roles of amino acid residues in enzyme catalysis. *Journal of Molecular Biology*, v. 390, p. 560–577, 2009.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 4ª edição. São Paulo-SP, Sarvier Editora de Livros Médicos LTDA, 2007.

MAZZOLA, P. G.; LOPES, A. M.; HASMANN, F. A.; JOZALA, A. F.; PENNA, T. C.; MAGALHAES, P. O.; RANGEL-YAGUI, C. O.; PESSOA JR. A. Liquid–liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83, 143–157, 2008.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology reviews*, v. 62, n.3, p.597-635, 1998.

PEREIRA, M. Purificação de uma endo-poligalacturonase, produzida por *Kluyvermyces marxianus*, utilizando sistemas de duas fases aquosas. Dissertação de Doutorado. Universidade do Minho, Portugal, 2005.

PORTO, T. S., 2004. Extração da pró-toxina épsilon e de protease a partir de *Clostridium perfringense* sistema de duas fases aquosas utilizando PEG/Citrato. Tese (Mestrado em Tecnologia Bioquímico- Farmacêutica). Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicilliumviridicatum* RFC3. Process Biochemistry, London, v. 40, n. 8, p. 2885- 2889, 2005.

SILVA, O. S., OLIVEIRA, R. L., SOUZA-MOTTA, C. M., PORTO, A. L. P., PORTO, T. S. Novel Protease from *Aspergillustamarii* URM4634: Production and Characterization Using Inexpensive Agroindustrial Substrates by Solid-State Fermentation. Advances in Enzyme Research. v. 4, p. 125-143. 2016 <http://dx.doi.org/10.4236/aer.2016.44012>

SANKEERTHANA, C.; PINJAR, S.; JAMBAGI, R. Production and Partial Characterization of Protease from *Aspergillus Flavus* using Rice Mill Waste as a Substrate and its Comparision with *Aspergillus Niger*. International Journal of Current Engineering and Techonology, v. 8580, n. Newse, p. 143 – 147, 2013.

STATSOFT, I. Statistica, version 8.0. ,2008.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecimentos aos órgãos de fomento FACEPE e CAPES